



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**"IDENTIFICACIÓN DE EXTRACTOS DE FUENTES NATURALES CON
ACTIVIDAD INHIBITORIA DE TIROSINASA"**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:
Q.A. FRIDA MONSERRAT HOSANNA
PAREDES RUIZ**

**DIRECTOR:
DR. JORGE SORIANO SANTOS**

MÉXICO, D.F.

"2013"

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001465”

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca 265661

México D.F. a 19 de Agosto del 2013

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**IDENTIFICACIÓN DE EXTRACTOS DE FUENTES NATURALES CON
ACTIVIDAD INHIBITORIA DE TIROSINASA**

que presentó

Q.A. Frida Monserrat Hosanna Paredes Ruiz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

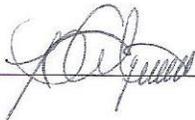
Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Ángel Miliar García

Jurado:

Presidente:

Dra. Edith Ponce Alquicira



Secretario:

Héctor Bernardo Escalona Buendía



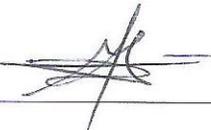
Vocal:

Ángel Miliar García



Vocal:

Gerardo Díaz Godínez



RESUMEN

La tirosinasa es la enzima clave de la melanogénesis en la cual el producto final es la melanina. La melanina es la responsable de proteger la piel contra el daño inducido por luz ultravioleta, pero el exceso de producción de melanina está relacionado con trastornos dermatológicos tales como la hiperpigmentación post-inflamatoria y melasma. Por ello en la industria cosmética se han buscado inhibidores de tirosinasa para dar tratamiento a estos padecimientos de la piel, pero muchos de ellos no han mostrado ser eficientes.

La Hidroquinona (HQ) es uno de los inhibidores sintéticos más eficientes, sin embargo se ha visto que la actividad inhibitoria de tirosinasa se debe a la destrucción de los melanocitos, por lo que es considerada como citotóxica y su uso es muy limitado, solo para tratamientos de melasma. En el caso de inhibidores de fuentes naturales se ha encontrado que son poco estables con la formulación y/o tienen poca penetración en la piel por lo que sus efectos son muy lentos. Estudios previos han mostrado que el uso de extractos de plantas (hoja, tallo y fruto) tienen actividad inhibitoria de tirosinasa la cual se ha relacionado con la presencia de polifenoles.

La actividad inhibitoria también ha sido relacionada con la capacidad quelante del ion Cu^{2+} (CuCA), ya que la tirosinasa tiene en su sitio activo este metal que favorece la oxidación de su sustrato (L-tirosina) y así desencadenar la serie de reacciones que forman la melanina.

Por ello el objetivo de este estudio es probar diferentes extractos de fuentes naturales como potenciales inhibidores de tirosinasa y evaluar su capacidad quelante de Cu^{2+} , tales como las proteínas e hidrolizados del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), hidrolizados del material lignocelulósico del tallo de amaranto y extractos de las diferentes plantas de muérdago *Cladoclea loniceroides*. Los cuales han mostrado tener gran cantidad de polifenoles.

Para ello fueron aisladas la albúmina 1, globulina y glutelinas del grano del amaranto, posteriormente fueron liofilizadas e hidrolizadas con alcalasa (E/S = 0.8 UA/g proteína; pH 7.4; T = 50°C) a diferentes tiempos (3, 21, 30, 36 y 48 h). Para conocer el avance de la

reacción se midió el grado de hidrólisis con la reacción de TNBS la cual se fundamenta con la cuantificación de los grupos amino libres.

La actividad de la tirosinasa fue medida utilizando L-tirosina (1 mg/ml), tirosinasa de champiñón (*Sigma-Aldrich* T3824-50KU) 96 U/ml y las muestras en DMSO al 5%. La reacción fue monitoreada por la formación de dopacromo (cromóforo estable que absorbe a $\lambda=475$ nm), cada minuto durante un periodo de 10 min.

La albúmina 1, globulina y glutelina no fueron utilizadas como sustrato por la tirosinasa, resultados similares fueron encontrados en caseína y ovoalbúmina, por lo que se esperaría que fueran potenciales inhibidores de la enzima. Sin embargo todas estas proteínas no tienen actividad inhibitoria de tirosinasa, por el contrario mejoran su actividad. Todos los hidrolizados de las proteínas del amaranto, caseína y ovoalbúmina también incrementaron la actividad.

Todos los hidrolizados de las proteínas del amaranto fueron separados por filtración en gel (Sephadex G-15) de los cuales solo rindieron una fracción de 0.8 kDa obtenida de albúmina 1, la cual pudo inhibir la actividad en 25 ± 2.29 %. Esta propiedad fue explicada por la baja capacidad quelante de Cu^{2+} la cual no fue suficiente para inhibir la actividad de la tirosinasa. La actividad inhibitoria de tirosinasa de la fracción de 0.8kDa no fue dependiente de la concentración (0.027 – 0.16 mg/ml).

En el caso de los hidrolizados del material lignocelulósico del tallo de amaranto, no se mostró efecto de inhibición ni de activación, sin embargo dichos hidrolizados presentan capacidad quelante de Cu^{2+} , lo cual podría indicar que la CuCA no necesariamente está relacionada con la actividad inhibitoria de tirosinasa.

En el estudio con la planta de muérdago *Cladocolea loniceroides* (Frutos verdes y maduros, hoja y tallo) utilizando diferentes solventes (agua, etanol, metanol, acetato de etilo, cloroformo y hexano), para la obtención de extractos, se logró obtener la mayor cantidad de polifenoles con agua, etanol y metanol. Siendo en estos mismos solventes en donde se presentó la mayor actividad inhibitoria de tirosinasa Etanol - Fruto Verde (75.26 ± 0.25 %), Agua - Fruto Maduro (76.14 ± 0.57 %), Metanol - Tallo (90.49 ± 1.96 %). Confirmando que la actividad inhibitoria de tirosinasa podría estar muy relacionada con la presencia de compuestos polifenólicos.

Todos los extractos presentan buena capacidad quelante de Cu^{2+} , sin embargo al realizar el ensayo de la cinética al extracto acuoso de muérdago que fue el que presentó el menor valor

de IC₅₀ (0.34 mgeq.Ác. Gálico/ml), se encontró que presenta inhibición no competitiva. Por lo que los extractos no compiten con el sustrato por el sitio activo, uniéndose a otro sitio de la enzima. Posiblemente no puedan entrar al sitio activo por impedimento estérico, como ocurrió en el caso de los hidrolizados de las proteínas del grano de amaranto, ya que los hidrolizados no lograron inhibir la actividad de la tirosinasa pero al fraccionar los hidrolizados se obtuvieron péptidos de menor tamaño que lograron inhibir la actividad en 25±2.29 %.

ABSTRACT

Tyrosinase is the key enzyme in melanogenesis in which the final product is melanin. Melanin is responsible for protecting the skin against UV-induced damage, but excessive production of melanin is related to skin disorders such as post-inflammatory hiperpigmenación melasma. So in the cosmetic industry tyrosinase inhibitors have sought to provide treatment for these skin conditions, but many of them have shown to be efficient.

Hydroquinone (HQ) is one of the most efficient synthetic inhibitors, however it has been found that the tyrosinase inhibitory activity is due to the destruction of melanocytes, so it is considered as cytotoxic and their use is very limited, only treatment of melasma. In the case of inhibitors from natural sources has been found to be very stable in the formulation and / or have little penetration into the skin so that its effects are very slow. Previous studies have shown that the use of extracts from plants (leaf, stem and fruit) have tyrosinase inhibitory activity which has been linked to the presence of polyphenols.

Inhibitory activity has also been associated with the chelating ability of the ion Cu^{2+} (CUCA), as tyrosinase is at its active site that metal which promotes oxidation of the substrate (L-tyrosine) and thus triggering a series of reactions that form melanin.

Therefore the aim of this study is to test different extracts from natural sources as potential tyrosinase inhibitors and evaluate its chelating ability Cu^{2+} , such as proteins and hydrolysates of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolyzed lignocellulosic material stem amaranth and extracts of different plants *Cladocolea loniceroides* mistletoe. Which have shown high amount of polyphenols.

To this one were isolated as albumin, globulin and glutelins grain amaranth were lyophilized and subsequently hydrolyzed with Alcalase ($E / S = 0.8 \text{ AU} / \text{g protein}$, pH 7.4, $T = 50^\circ \text{C}$) for

different times (3, 21, 30, 36 and 48 h). For the progress of the reaction was measured by the degree of hydrolysis reaction with TNBS which is based in the quantification of free amino groups.

The tyrosinase activity was measured using L-tyrosine (1 mg / ml), mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich T3824-50KU) 96 U / ml and the samples in 5% DMSO. The reaction was monitored by the formation of dopachrome (stable chromophore which absorbs at $\lambda = 475$ nm), each minute during a period of 10 min.

1 albumin, globulin, glutelin, and were not used as a substrate for tyrosinase, similar results were found in casein and ovalbumin therefore be expected to be potential inhibitors of the enzyme. However, all these proteins have no tyrosinase activity inhibitoria, on the contrary improve its activity. All hydrolyzed amaranth protein, casein, and also increased activity ovoalbumina.

All hydrolyzed amaranth protein were separated by gel filtration (Sephadex G-15) which yielded only a fraction of 0.8 kDa albumin obtained 1, which could inhibit the activity at $25 \pm 2.29\%$. This property was explained by the low capacity of Cu^{2+} + chelator which was not sufficient to inhibit tyrosinase activity. Tyrosinase inhibitory activity of the fraction of 0.8kDa was not dependent on the concentration (from 0.027 to 0.16 mg / ml).

In the case of hydrolysates of lignocellulose stem amaranth, was not inhibitory effect or activation, however such hydrolysates have chelating ability of Cu^{2+} , which could indicate that the CUCA not necessarily associated with the inhibitory activity of tyrosinase.

In the study with mistletoe plant *Cladocolea loniceroides* (ripe and unripe fruit, leaf and stem) using different solvents (water, ethanol, methanol, ethyl acetate, chloroform and hexane) to obtain extracts were able to obtain the greatest amount of polyphenols with water, ethanol and

methanol. Being in these same solvents which showed the highest tyrosinase inhibitory activity Ethanol - Fruit Green ($75.26 \pm 0.25\%$), Water - Fruit Maduro ($76.14 \pm 0.57\%$), Methanol-Stem ($90.49 \pm 1.96\%$). Confirming that the inhibitory activity of tyrosinase may be closely related to the presence of polyphenolic compounds.

All extracts have good chelating ability of Cu^{2+} , however when performing kinetic assay of the aqueous extract of mistletoe was the one who had the lowest IC 50 value ($0.34 \text{ mgeq.Ác. Gallic / ml}$), we found that presents noncompetitive inhibition. Extracts therefore not compete with the substrate for the active site, binding to another site of the enzyme. Possibly cannot enter the active site by steric hindrance, as in the case of protein hydrolysates from grain amaranth as hydrolysates failed to inhibit tyrosinase activity but hydrolysates obtained fractionating smaller peptides that inhibit the activity achieved in $25 \pm 2.29\%$.

CONTENIDO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	1
1. GENERALIDADES	1
1.1. Melanogénesis	1
1.2. La radiación solar ultravioleta y la piel	2
1.3. Tirosinasa	3
1.3.1. Inhibidores de tirosinasa y su aplicación	4
1.4. Cosmecéuticos, nutracéuticos y nutricosméticos	5
1.5. Industria Nutricosmética.....	6
1.5.1. Características del mercado mundial de nutricosméticos.....	7
1.6. Uso potencial de péptidos bioactivos como inhibidores de tirosinasa	8
1.6.1. Importancia de la capacidad quelante de Cu^{2+} en la actividad inhibitoria de tirosinasa.....	10
1.6.2. Péptidos bioactivos encontrados en el grano de amaranto.	11
1.7. Importancia de polifenoles en la actividad inhibitoria de tirosinasa	14
1.8. Importancia de la actividad antioxidante en la actividad inhibitoria de tirosinasa.....	15
1.8.1. Tipos de Antioxidantes y métodos de cuantificación.....	15
1.8.2. Contenido de polifenoles en el muérdago	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVO GENERAL	22
4.1. Objetivos específicos.....	22
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1. Desengrasado de harina de amaranto.....	24
5.2. Extracción de Albúmina 1 y globulina con Na_2SO_4	24
5.3. Extracción de Glutelina con Etanol	25
5.4. Hidrólisis enzimática de Albúmina 1, globulina y glutelina con Alcalasa	25
5.5. Determinación del grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1979).....	25
5.6. Hidrolisis ácida del tallo de Amaranto.....	26

5.7.	Extracción de polifenoles totales de muérdago	27
5.8.	Cuantificación de polifenoles totales	28
5.9.	Método de decoloración del radical catiónico ABTS	29
5.10.	Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•)	29
5.11.	Actividad quelante de Cu^{2+}	29
5.12.	Actividad inhibitoria de la tirosinasa	30
5.13.	Estudio de la cinética.....	31
5.14.	Medición del IC_{50}	31
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1.	Evaluación de la planta de amaranto	32
6.1.1.	Evaluación de las proteínas del grano de Amaranto.....	32
6.1.2.	Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por hidrolizados del material Lignocelulósico del tallo de amaranto.....	45
6.1.3.	Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por extractos de Tallo de Amaranto	48
6.2.	Evaluación de extractos polifenólicos de la planta de muérdago	49
6.2.1.	Cuantificación de polifenoles de extractos de muérdago	49
6.2.2.	Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	51
6.2.3.	Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por extractos de Muérdago	54
6.2.4.	Evaluación de la actividad quelante sobre el ion Cu^{2+} de los extractos de muérdago	57
6.2.5.	Evaluación de IC_{50}	61
6.2.6.	Parámetros cinéticos de la tirosinasa en presencia del extracto acuoso de muérdago	62
6.3.	Resumen de resultados de la evaluación de las plantas de amaranto y muérdago	65
6.3.1.	Resultados de la planta de amaranto.....	65
6.3.2.	Resultados de la planta de muérdago	66
7.	CONCLUSIONES.....	67
8.	RECOMENDACIONES	70
9.	BIBLIOGRAFÍA	71

10. APÉNDICES..... 78

 Apéndice A..... 78

 Apéndice B..... 79

 Apéndice C..... 80

 Apéndice D..... 83

 Apéndice E..... 84

 Apéndice F..... 85

 Apéndice G..... 86

 Apéndice H..... 87

 Apéndice I..... 92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones para la síntesis de melanina.....	3
Figura 2. Relación de cosmeceúticos, nutraceuticos y nutricosméticos.....	7
Figura 3. Mercado mundial de nutricosméticos.....	8
Figura 4. Producción de amaranto.....	11
Figura 5. Predicción de posibles bioactividades presentes en la secuencia de la proteína del grano de amaranto y la frecuencia con la que se presentaría cada una de ellas.	13
Figura 6. Formación del radical cationico ABTS, y reacción en presencia de un antioxidante (Trolox), para su estabilización.	17
Figura 7. Reacción de reducción del radical DPPH•.....	18
Figura 8. Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin Ciocalteu.....	19
Figura 9. Estrategia experimental a seguir para la evaluación del grano de amaranto.....	23
Figura 10. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis de albúmina 1 con alcalasa.....	26
Figura 11. Estrategia para obtener los extractos de muérdago.....	28
Figura 12. Estrategia experimental para determinar el grado de inhibición de la tirosinasa por la acción de los hidrolizados de albúmina 1, globulina y glutelina.....	30
Figura 13. Cromatograma de hidrolizado de albúmina de 3h, columna de filtración en gel Sephadex G-15. Vo.- volumen vacío, Vf.- volumen total. FI.- fracción 1 del hidrolizado de albúmina de 3h (Mr = 457 kDa), FII.- fracción 2 del hidrolizado de albúmina de 3h (Mr = 457 kDa).....	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Péptidos sintéticos utilizados en cosmeceúticos.....	9
Tabla 2. Composición química del grano de Amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus L.</i>) ...	12
Tabla 3. Polifenoles totales presentes en las diferentes partes de la planta de amaranto.	13
Tabla 4. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de muérdago.....	19
Tabla 5. Orden de adición de reactivos para la hidrólisis de albúmina 1, globulina y glutelina del grano de amaranto con alcalasa.	25
Tabla 6. Orden de adición de reactivos para la determinación de grado de hidrólisis (GH) de albumina 1 del grano de amaranto.....	26
Tabla 7. Factor de relación de ABS 475nm/ABS530nm de las fracciones de hidrolizados de proteína de amaranto.	43
Tabla 8. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de muérdago.....	50
Tabla 9. Porcentajes de Inhibición del radical ABTS y en equivalentes de Trolox de cada extracto de muérdago.....	52
Tabla 10. Porcentajes de Inhibición del radical ABTS y en equivalentes de Trolox de cada extracto de muérdago.....	53
Tabla 11. Valores IC ₅₀ de inhibición de Tirosinasa de extractos de muérdago.....	61
Tabla 12. Parámetros cinéticos de tirosinasa con diferentes concentraciones de extracto acuoso de muérdago.	63

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Grado de hidrolisis de las proteínas del grano de amaranto.	32
Gráfica 2. Proteínas como sustrato de tirosinasa.	33
Gráfica 3. Evaluación de actividad inhibitoria de las Proteínas de amaranto.	33
Gráfica 4. Evaluación de actividad inhibitoria de caseína y ovoalbúmina.	34
Gráfica 5. Evaluación de actividad inhibitoria de hidrolizados de Albumina 1 de Amaranto.	35
Gráfica 6. Evaluación de actividad inhibitoria de hidrolizados de Globulina de Amaranto.	35
Gráfica 7. Evaluación de actividad inhibitoria de hidrolizados de Glutelina de Amaranto.	36
Gráfica 8. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de Albumina 1 de Amaranto.	37
Gráfica 9. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de globulina de Amaranto.	37
Gráfica 10. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de glutelina de Amaranto.	38
Gráfica 11. Evaluación de la actividad inhibitoria de tirosinasa de hidrolizados de ovoalbúmina.	39
Gráfica 12. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de ovoalbúmina.	39
Gráfica 13. Evaluación de la actividad inhibitoria de tirosinasa de hidrolizados de caseína.	40
Gráfica 14. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de caseína.	41
Gráfica 15. Fracciones peptídicas de hidrolizados de proteínas de amaranto con mayor actividad inhibitoria de la tirosinasa.	42
Gráfica 16. Evaluación de la concentración de péptido sobre la actividad inhibitoria de tirosinasa.	44
Gráfica 17. Evaluación de la actividad inhibitoria de los hidrolizados del material lignocelulósico del amaranto a una concentración de Polifenoles de 1.25 mgeq. Ac Gálico/ml.	45
Gráfica 18. Evaluación de la actividad inhibitoria de los hidrolizados del material lignocelulósico del amaranto a una concentración de Polifenoles de 1.67mgeq. Ác. Gálico/ml.	45
Gráfica 19. Evaluación de la actividad inhibitoria de los hidrolizados del material lignocelulósico del amaranto a una concentración de Polifenoles de 2.08 mgeq. Ác. Gálico/ml.	46

Gráfica 20. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 120°C a diferentes tiempos. .47	47
Gráfica 21. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 110°C a diferentes tiempos. .47	47
Gráfica 22. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 100°C a diferentes tiempos. .47	47
Gráfica 23. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 90°C a diferentes tiempos.48	48
Gráfica 24. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos del tallo de amaranto.48	48
Gráfica 25. Actividad quelante de los extractos del tallo de amaranto.49	49
Gráfica 26. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos Agua - Fruto.Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.55	55
Gráfica 27. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de etanol de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.55	55
Gráfica 28. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de metanol de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.55	55
Gráfica 29. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de acetato de etilo de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.56	56
Gráfica 30. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de cloroformo de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.56	56
Gráfica 31. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de hexano de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.56	56
Gráfica 32. Actividad quelante de extractos acuosos de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.58	58
Gráfica 33. Actividad quelante de extractos de extractos de etanol de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.58	58
Gráfica 34. Actividad quelante de extractos de extractos de metanol de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.59	59
Gráfica 35. Actividad quelante de extractos de extractos de cloroformo de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.59	59
Gráfica 36. Actividad quelante de extractos de extractos de acetato de etilo de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.60	60
Gráfica 37. Actividad quelante de extractos de extractos de hexano de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.60	60

Gráfica 38. Gráfica Lineweaver-Burk de la inhibición de Tirosinasa en presencia de extracto acuoso de muérdago.	63
Gráfica 39. Gráfica de las pendientes Vs concentraciones de extracto acuoso de fruto maduro, para determinar la constante de inhibición K_i	64

1. Generalidades

1.1. Melanogénesis

La melanina, el producto final de la melanogénesis, determina el color de la piel humana, cabello y ojos, y es sintetizada internamente por los únicos orgánulos unidos a membrana llamados melanosomas. El tipo y la cantidad de melanina y su patrón de distribución en los queratinocitos circundantes determinan el color real de piel (Parvez *et al.*, 2006).

La Melanogénesis está regulada por diversos factores ambientales, hormonales y genéticos, como la exposición UV, una-hormona estimulante de melanocitos, (Kadekaro *et al.*, 2003; Petit y Pierard, 2003).

Las funciones de la melanina de la piel incluyen:

1. La protección contra la radiación UV
2. El inhibición de fotocarcinogénesis,
3. La síntesis de vitamina D3 (Lindquist, 1973).

La hiperpigmentación es un trastorno muy frecuente y generalmente inofensivo en el que aparecen puntos en la piel se vuelven de color más oscuro que el color normal que rodea la piel. Este oscurecimiento se produce cuando un exceso de melanina es formado y depositado en la piel. La alteración más común de pigmentación para la cual los pacientes buscan tratamiento es el Melasma e hiperpigmentación post-inflamatoria (PIH - post-inflammatory hyperpigmentation) (Lynde *et al.*, 2006). Estas condiciones pueden tener mayor impacto en una persona psicológicamente y en el bienestar social, contribuir con la disminución de la productividad, el funcionamiento social, y autoestima (Finlay, 1997).

El melasma es un trastorno de pigmentación adquirido que se produce en las mujeres de todos los grupos raciales y étnicos (Rendón *et al.*, 2006). Aunque la causa del melasma es desconocida, los factores son la predisposición genética, exposición a la luz UV, y los estrógenos (Johnston *et al.*, 1998). PIH representa una respuesta patofisiológica a la inflamación cutánea, tales como acné atópico, dermatitis, liquen plano, dermatitis crónica, y erupciones fototóxicas (reacciones alérgicas a los medicamentos, junto con la exposición a la luz solar) (LacZ *et al.*, 2004).

1.2. La radiación solar ultravioleta y la piel

En los últimos años se ha utilizado radiación solar ultravioleta en estudios epidemiológicos, clínicos y de laboratorio en diversas enfermedades de la piel, envejecimiento prematuro y el cáncer de piel del tipo melanoma y no melanoma. Exposición excesiva de la piel a la radiación UV causa inflamación, estrés oxidativo, daño en el ADN, etc.

La piel es el órgano más grande del cuerpo, que cuenta con una superficie de aproximadamente 1.5 a 2.0 m², tiene como función proteger los órganos internos del cuerpo, actuando como una barrera eficaz contra los efectos perjudiciales tanto del medio ambiente como de agentes xenobióticos.

La exposición a la radiación UV solar es el factor clave en la iniciación de diversos trastornos de la piel, tales como: arrugas, descamación, sequedad, manchas anormales de pigmento e inclusive, hipopigmentación, hiperpigmentación y cáncer de piel (Nichols y Katiyar, 2010). Aunque muchos factores ambientales y genéticos contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades de la piel, el factor más importante es la exposición crónica a la radiación solar UV. Esta radiación solar puede ser dividida en tres grupos basados en sus longitudes de onda (Nichols y Katiyar, 2010)

Onda corta (UVC, 200-290 nm). En gran parte es absorbida por la capa de ozono en la atmósfera por lo que normalmente no llega a la superficie de la tierra. Puede penetrar la piel a una profundidad de aproximadamente 60 a 80 µm son causantes de daño y mutaciones en las moléculas de ADN.

Onda media (UVB, 290-320 nm). Constituye aproximadamente el 5% del total de la radiación solar UV y es el principal responsable de una gran variedad de enfermedades. Puede penetrar la piel a una profundidad aproximada de 160 a 180 µm, cruza toda la capa de la epidermis y parte de la dermis de la piel humana. Induce tanto efectos biológicos adversos, tanto directos como indirectos, como la inducción de estrés oxidativo, daño al ADN, envejecimiento prematuro, cáncer de piel, múltiples efectos en el sistema inmune y puede funcionar como iniciador, promotor y co-cancerígeno en la formación de tumores.

Onda larga (UVA 320-400 nm). Comprende la mayor parte del espectro de radiación solar (90-95%), penetra más profundo en la epidermis y la dermis de la piel con una profundidad de

aproximadamente 1000 μm . Se ha demostrado que la amplia exposición a estos rayos puede conducir a la formación de tumores tanto benignos como malignos. De igual forma, inducen la generación oxígeno singulete y radicales hidroxilo, causantes de daños a macromoléculas, tales como: proteínas, lípidos y ADN. Siendo su acción mutagénica y carcinogénica mediada por especies reactivas del oxígeno se puede considerar una fuente significativa de estrés oxidativo en la piel humana, provocando con ello fotoenvejecimiento (flacidez de la piel, arrugas y supresión de algunas funciones inmunes).

1.3. Tirosinasa

La tirosinasa es una enzima multifuncional, monooxigenasa contenedora de cobre, y se considera la enzima clave de la melanogénesis en mamíferos (Sánchez- Ferrer *et al.*, 1995). Esta enzima cataliza dos reacciones distintas en la ruta de biosíntesis de la melanina (Figura 1):

- 1) La hidroxilación de un monofenol (tirosina) y,
- 2) La conversión de una o-difenol (dopa) a la correspondiente o quinona (Dopaquinona).

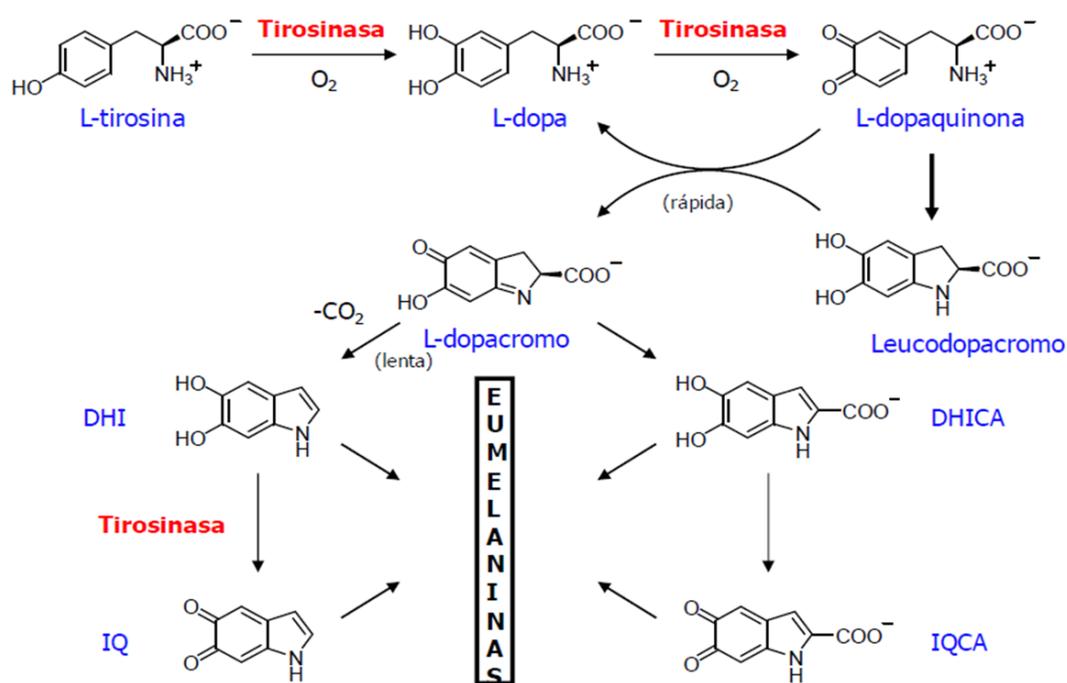


Figura 1. Reacciones para la síntesis de melanina.

1.3.1. Inhibidores de tirosinasa y su aplicación

Una gran cantidad de diferentes inhibidores de la tirosinasa se utiliza en la actualidad para tratar enfermedades epidérmicas de hiperpigmentación. Los agentes despigmentantes de piel en la industria de los cosméticos incluyen hidroquinona (Jimbow *et al.*, 1974), arbutina (Maeda y Fukuda, 1996), ácido kójico (Cabanés *et al.*, 1994), vitamina C (Kojima *et al.*, 1995), retinol (Pathak *et al.*, 1986), ácido azelaico (Schallreuter y Wood, 1990), y otros ingredientes botánicos. El agente despigmentante más popular es la hidroquinona (Dihidroxibenceno; HQ), que ha estado en uso desde 1961. HQ, con formulaciones de 2-4 %, ha sido ampliamente utilizado para tratamiento de melasma y los informes de su eficacia clínica ha sido bien documentada (Ennes *et al.*, 2000). HQ inhibe la conversión de dopa en melanina mediante la inhibición de la actividad de tirosinasa (Palumbo *et al.*, 1991).

Además de la inhibición de tirosinasa, estudios previos sugirieron que la HQ ejerce su efecto sobre la melanogénesis través de la degradación de los melanosomas y destrucción de los melanocitos. Se encontró también alteración de la función de los melanosomas, el agotamiento de glutatión, la generación de especies reactivas de oxígeno, y el posterior daño oxidativo de los lípidos de membrana (Briganti *et al.*, 2003). HQ es considerada citotóxica para los melanocitos, potencialmente mutagénico en células de mamíferos, y causa irritación de la piel. Debido al riesgo a la largo plazo de mutagénesis (DeCaprio, 1999), el uso de la HQ en cosméticos ha sido prohibido por el Comité Europeo (24 de Dir. 2000/6/CE) y las formulaciones de un 4% sólo están disponibles por la prescripción en otros países. Esto ha conducido al uso de agentes alternativos tales como ácido kójico y arbutina. Sin embargo, estos agentes no presentaron eficacia en estudios *in vivo*, ya que los ensayos clínicos han sido desfavorables hasta la fecha. La eficacia de estos productos parece estar limitada debido a sus efectos adversos, poca penetración en la piel, y la baja estabilidad en la formulación (Hermanns *et al.*, 2000).

Recientemente, los investigadores han centrado su atención a los péptidos de secuencia corta como potenciales candidatos terapéuticos para el tratamiento de trastornos de la piel. El péptido más ampliamente estudiado con la secuencia peptídica es lisina-treonina-treonina-lisina-serina (KTTKS) que se encuentra en procolágeno tipo I. Este pentapéptido se ha

demostrado que estimula la regulación de la síntesis de nuevo colágeno y produce un aumento de la producción de proteínas de matriz extracelular, como colágeno tipo I y II y fibronectina, mejorando significativamente la salud de la piel facial humana fotoenvejecida. Se han examinado oligopéptidos para detectar si hay actividad inhibitoria frente a la tirosinasa y la ausencia de toxicidad de melanocitos. Se han descubierto varias secuencias cortas de péptidos que cumplen estos dos criterios.

1.4. Cosmecéticos, nutracéuticos y nutricosméticos

En la actualidad existen un gran número de compuestos, naturales y sintéticos, que son utilizados como principio activo de productos que se conocen como cosmecéticos, nutracéuticos y nutricosméticos. Estos términos no son tan diferentes y no pueden ser separados totalmente unos productos de otros. A continuación se explicaran sus diferencias y coincidencia.

Se conocen como cosmecéticos a los productos que están relacionados a la industria cosmética y a la salud, es decir, son productos cosméticos que dicen tener medicamento o compuestos que funcionan principalmente como productos farmacéuticos presentando beneficios similares a ellos (Amer *et al.*, 2009; Bissett, 2009), proporcionando un beneficio principalmente a la piel. La característica principal de estos productos, que los diferencia de los nutracéuticos y nutricosméticos, es la forma de aplicación que, en este caso, son productos de uso tópico (se colocan o frotan sobre la piel). Realizando de esta forma alguna transformación en los seres humanos, como por ejemplo: anti-envejecimiento, blanqueadores de piel, tratamientos contra el acné, cremas dentales, anti-celulitis, antitranspirantes, etc.

En estos productos cosmecéticos se utilizan un gran número de compuestos que tienen la capacidad que modificar la apariencia de la piel. Entre estos productos, que en su mayoría son antioxidantes o antimicrobianos, se pueden encontrar polifenoles y biopéptidos (Amer *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009) cuya función es la de proteger a la piel de los efectos causados por la luz UV, dichos daños consisten en inflamación, apoptosis celular e incluso cáncer. Entre los péptidos que se han utilizados podemos encontrar los de colágeno y elastina.

Los nutracéuticos son aquellos alimentos o compuestos químicos que no solo cumplen con la función de proporcionar nutriente, sino también, regulan alguna actividad biológica en el

organismo humano proporcionando beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades de una manera similar a los agentes farmacéuticos. A estos productos también se les conocen como "alimentos funcionales". Ejemplos: yogurts, bebidas, barras energéticas, etc.

Finalmente, los nutricosméticos son suplementos nutricionales que pueden apoyar la función y estructura de la piel. Se sabe que muchos micronutrientes tienen este efecto. Un claro ejemplo de ellos es la vitamina C, la cual tiene un efecto antioxidante que reduce el impacto de los radicales libres (RL) y estimula la producción de colágeno en la dermis. Otros nutrientes como algunos ácidos grasos omega-3, carotenos y flavonoides protegen la piel de los efectos dañinos de los rayos ultravioletas, reduciendo el envejecimiento y la formación de arrugas (Draelos, 2010). Estos productos tienen la capacidad no solo de nutrir, sino también de proteger a la piel, cabello y/o uñas, promoviendo la "belleza de dentro para fuera".

Uno de los pioneros en este campo y por muchos considerados como el "Padre del cuidado interno de la piel" es el bioquímico sueco Ake Dahlgren. Él inventó el mundo de Nutricosméticos a fines de 1980 y se llamó Imedeem.

1.5. Industria Nutricosmética

Los especialistas en nutrición hacen mucho énfasis en que llevar una alimentación balanceada beneficia a la salud, pero no solo eso, sino también que ayudan a mejorar la apariencia física de las personas. Partiendo de esto, la industria cosmética en sociedad con la industria de alimentos ha puesto a la venta una nueva categoría de productos que tienen como finalidad principal mejorar la apariencia de la piel, cabello y uñas (Cosmetics & Toiletries, 2009).

Los cosméticos nutritivos, mejor conocidos en la industria como nutricosméticos, son suplementos nutricionales que pueden apoyar y/o mejorar la función y estructura de la piel. Estos productos tienen como característica principal que no son de aplicación tópica, a pesar de ser considerados cosméticos, sino que la presentación en la que se distribuyen debe ser de consumo oral, proporcionando de esta forma no solo beneficios nutricionales, sino estéticos.

El término nutricosmético no es independiente de los términos nutracéuticos y cosmeceúticos ya que los tres productos buscan ayudar a la salud y belleza del cuerpo en general a través de productos que complementen la alimentación diaria (Figura 2).

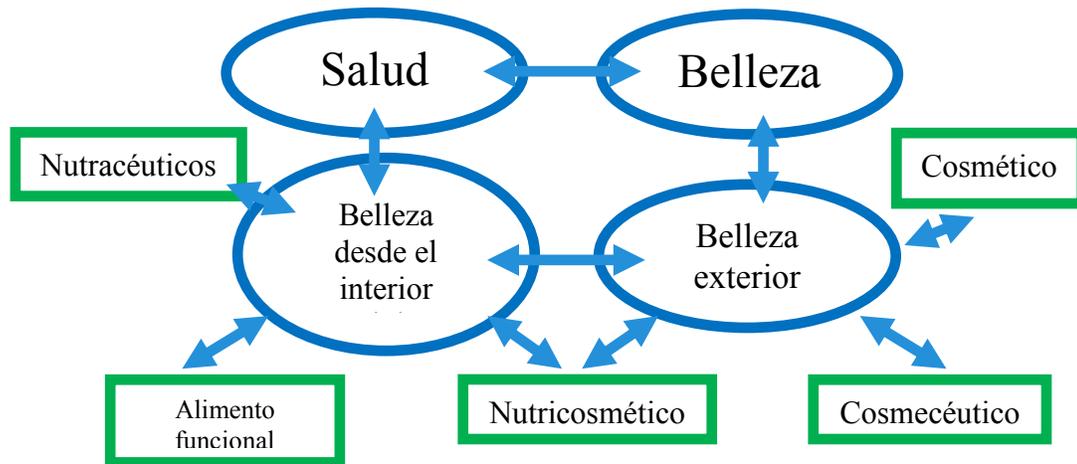


Figura 2. Relación de cosmeceúticos, nutracéuticos y nutricosméticos.

1.5.1. Características del mercado mundial de nutricosméticos

El creciente interés por una dieta saludable con el fin de lograr el bienestar personal se basa en: la reducción de riesgo en el padecimiento de enfermedades, la nutrición en cada etapa de vida y de acuerdo al género, prevención y solución contra la obesidad y la “belleza desde el interior”. Con base en lo anterior los consumidores están dispuestos a pagar por productos anti-envejecimiento conocidos como nutricosméticos (Tabor y Blair, 2009).

En este ámbito, Japón fue el primer país en desarrollar este tipo de productos y se ha encargado de actualizarlo de forma constante. Por lo general estos productos se centran en el cuidado de la piel, o el apoyo a la "belleza total", es decir, no solo son productos nutritivos con efectos benéficos para la salud, sino también proporcionan belleza externa.

Actualmente el mercado de nutricosméticos ha sido acaparado por tres sectores: Europa, Japón y Estados Unidos, con un 51, 44 y 3% respectivamente. De una venta total anual de \$1.5 mil millones (Figura 3).

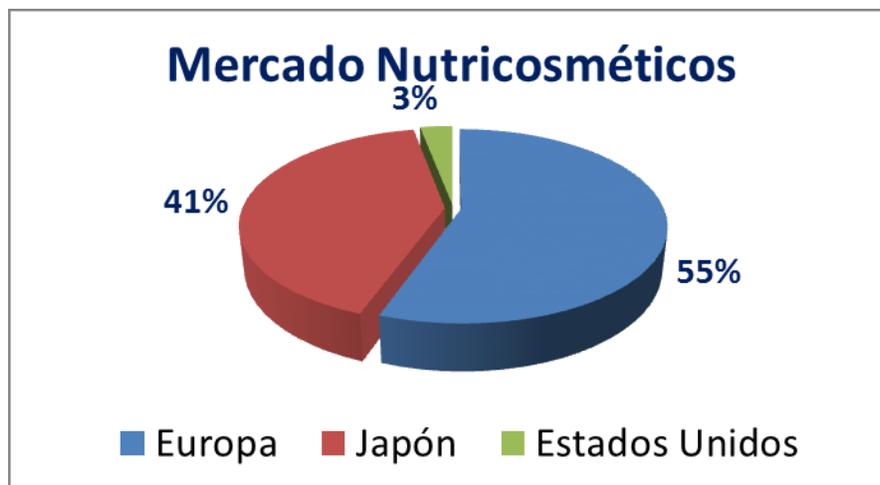


Figura 3. Mercado mundial de nutricosméticos

1.6. Uso potencial de péptidos bioactivos como inhibidores de tirosinasa

En los últimos años se han reportado diversos trabajos de investigación en los que se aíslan aminoácidos, péptidos y proteínas que poseen Capacidad Antioxidante (CAOx) actuando contra la peroxidación de los lípidos o ácidos grasos. Se cree que esta CAOx se debe a que los aminoácidos o grupos de azufre reaccionan con hidroperóxidos resultantes de la oxidación de lípidos.

Los péptidos bioactivos, que se definen como un compuesto que tiene la posibilidad de regular las funciones biológicas en el organismo humano ya que, al ser consumidos se absorben por los enterocitos del intestino, siendo liberados posteriormente dentro de los espacios inter-intestinales y transferidos a través de las paredes capilares hacia la sangre, donde liberan su actividad biológica benéfica y que, al mismo tiempo tienen un valor nutricional (Lupo y Cole., 2007).

Los péptidos que han sido aislados tanto de fuentes animales como vegetales. Realizando la hidrólisis enzimática de proteínas que tienen características comunes, independientes a la fuente proteínica de la que provengan, como por ejemplo: ser de cadena corta (2-12 aminoácidos) y presentar en la cadena péptidica aminoácidos, que por sí solos presentan CAOx pero que una vez que se encuentran dentro de la cadena aumentan su la actividad, como la His, Pro y Tir.

Estos péptidos tienen un alto potencial de ser utilizados en la formulación de nutricosméticos, ya que se ha demostrado que son capaces de intervenir en las reacciones de óxido-reducción, causantes de estrés oxidativo, solo que para estos productos se buscaría prevenir el estrés oxidativo y daños a macromoléculas en la piel.

En la formulación de productos cosméticos y nutricosméticos se han utilizado, desde hace 50 años, péptidos sintéticos cuya secuencia fue aislada y purificada a partir del organismo humano. Una vez identificada su secuencia y sus funciones son sintetizados a gran escala para la formulación de alimentos funcionales (Tabla 1). Dichos péptidos se caracterizan por ser de cadena corta (2 a 16 aminoácidos) y su función principal es la de intervenir en la síntesis y regeneración del colágeno en la piel (Zhan *et al.*, 2009).

Tabla 1. Péptidos sintéticos utilizados en cosmeceúticos.

Compañía	Nombre	Actividad	Fuente
Atrium	Tripéptido	Estimulación de la matriz extracelular a través de la estimulación del factor de crecimiento.	Factor de crecimiento de hepatocitos.
Grant Indust	Hexapéptido palmitoil-6	Reparación de capa dérmica.	Hormona estimulante de melanocitos
Pentapharm	Tripéptido palmitoil-5	La síntesis de colágeno a través de factor de crecimiento β .	Trombospondina 1
Sederma	Palmitoil pentapéptido-3	Estimulación síntesis de colágeno a través de la señalización.	Procolageno

También existen buenos péptidos de unión a la tirosinasa derivados de proteínas industriales por lo general contienen residuos de aminoácidos Arg y/o Phe.

La importancia de la Phe en la interacción péptido-tirosinasa se podría explicar por el hecho de que Phe es estructuralmente similar a Tyr, que es el sustrato natural para la tirosinasa. Sin embargo, la unión de los péptidos que contienen Tyr no se pueden establecer, ya que Tyr se oxida después de la incubación de péptidos con tirosinasa-MB. Al parecer, los péptidos que contiene el residuo dopaquinona no hacen que se unan muy bien a tirosinasa. También péptidos que contienen un residuo de Asp o Glu hacen que no se unan muy bien a la tirosinasa, lo que sugiere que una carga negativa no es favorable para la unión tirosinasa.

Buenos péptidos inhibidores de la tirosinasa derivados de proteínas industriales por lo general contienen un ácido hidrófobo, amino alifático residuo Val, Ala, Leu, Met y / o Ile. El residuo

aromático hidrófobo, Phe, que es relativamente importante en la interacción tirosinasa-péptido, es menos importante en la inhibición tirosinasa. Al parecer, a pesar de sus similitudes estructurales con Tyr, Phe probablemente no sea la unión al sitio activo de tirosinasa. La Phe no parece ser un muy buen inhibidor de la tirosinasa. Además de los residuos hidrófobos mencionados anteriormente, los péptidos que contienen, residuos de Cys y Ser, y en un grado menor Thr, son buenos así como inhibidores de la tirosinasa. La inhibición de la tirosinasa observada para los péptidos que contienen Ser y/o Thr es más probablemente similar al mecanismo de inhibición por Cys.

En algunos casos la unión de péptidos a la tirosinasa puede dar como resultado una activación de la tirosinasa. Esto suele ocurrir con los péptidos que contienen residuos de Tyr y / o Trp. La presencia de residuos de Tyr en los péptidos de unión a la tirosinasa causan una activación aparente, ya que se oxidan por la tirosinasa. Por supuesto, péptidos contenedores de Tyr todavía pueden actuar como inhibidores competitivos de L-DOPA con tirosinasa por oxidación, pero la actividad de la tirosinasa y por lo tanto la formación de quinonas no se ve afectada. Algunos péptidos de unión relativamente buenos de tirosinasa no contienen Tyr o Trp y siguen activando la tirosinasa. Un ejemplo de un péptido de unión relativamente bueno de tirosinasa que simultáneamente activa la tirosinasa es RINKKIEK. El péptido RINKKIEK es un péptido inhibidor de la lipoxigenasa identificado a partir de β -caseína. Aunque RINKKIEK es también péptido de unión a la tirosinasa, que parece tener un efecto opuesto sobre la actividad de esta enzima (Schurink *et al.*, 2006).

1. 6.1. Importancia de la capacidad quelante de Cu^{2+} en la actividad inhibitoria de tirosinasa

Conociendo que la tirosinasa es una proteína bifuncional de cobre, la actividad inhibitoria de la tirosinasa se puede determinar mediante la capacidad quelante de cobre (Kubo y Kinst Hori, 1999). Resultados demuestran que tanto el suero de leche y péptidos del kéfir podrían quelar cobre en la tirosinasa. Concentraciones superiores de ambos componentes mostraron un aumento en la capacidad de quelación. Los resultados, consistentes con el ensayo de la tirosinasa, podría explicar el mecanismo de inhibición contra la síntesis de melanina.

Para ello se midió la absorbancia a 485 y 530 nm. Se usó trimetil-murexida (TMM) que es un agente quelante, que presenta una máxima absorción a 530nm, y forma una complejo con el Cu^{2+} libre excepto el Cu^{2+} unido por la muestras. El complejo TMM- Cu^{2+} muestra una absorción máxima a 485nm. La actividad quelante de Cu^{2+} fue determinada por la relación de 485 nm/530 nm. Los valores más bajos muestran la mejor actividad quelante de cobre (Chen *et al.*, 2006).

1.6.2. Péptidos bioactivos encontrados en el grano de amaranto.

En nuestro país las principales entidades productoras de amaranto son Puebla, Morelos, Estado de México, Tlaxcala y Distrito Federal con el 51, 7, 6, 4 y 3 % respectivamente de la producción total nacional (SAGARPA, 2010, Morales *et al.*, 2009).

Aunque no son solo estos estados los que cultivan este grano los cuales en conjunto representan el 28% de la producción total (Figura 4).

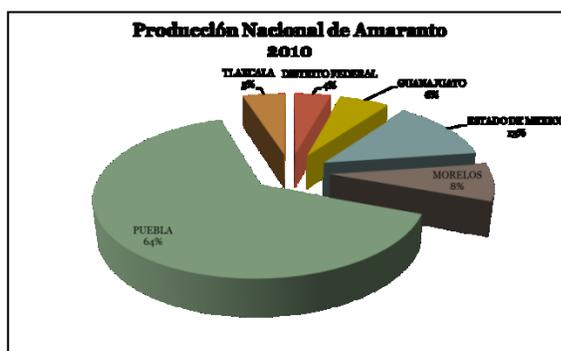


Figura 4. Producción de amaranto.

El contenido de proteína el grano de amaranto que se ha reportado va de entre 13 y 19 % (Konishi *et al.*, 1985), dicha proteína contiene 6.1 % lisina (Bressani *et al.* 1990; Paredes *et al.*, 2006), aminoácido esencial para la nutrición humana. En comparación con los cereales comunes cuyo contenido de proteína lisina es de entre 8.5 % a 14 % y 2.2 % a 4.5 % respectivamente. La composición química de este grano incluye 7.7 % de lípidos y 67 a 75.5 % de carbohidratos (Bressani *et al.*, 1987), como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química del grano de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*)

Componente	g/100 g
Proteína Cruda	13-19 (Konishi <i>et al.</i> , 1985)
Lípidos	7.7 (Soriano <i>et al.</i> , 1992)
Carbohidratos	57 (Bressani <i>et al.</i> , 1987)
Fibra	6.7 (Soriano <i>et al.</i> , 1992)
Cenizas o minerales	2.5 (Soriano <i>et al.</i> , 1992)
Agua	13 (Soriano <i>et al.</i> , 1992)

Las principales fracciones de proteínas que se han identificado del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*) de acuerdo a la clasificación de Osborne (1924) son: albúmina, globulina y glutelina (Soriano *et al.*, 1992). La albúmina se ha descrito por algunos autores como la proteína más abundante del grano y está compuesta por dos tipos: albúmina 1 y 2 de acuerdo al orden de extracción (Segura *et al.*, 1994). Dichas fracciones proteicas presentan diversos patrones de distribución de aminoácidos, las albúminas contienen altas proporciones de ácido glutámico y aspártico, así como de lisina y valina.

Posteriormente se publicó (Silva *et al.*, 2008) una investigación donde se dice que la semilla del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es rico en proteínas, pero que no se tiene información con respecto a sus compuestos bioactivos que podrían proporcionar un beneficio a la salud. Por lo que realizan una predicción confrontando 36 secuencias de proteínas y 1573 péptidos ya conocidos que presentan alguna de las 39 actividades biológicas ya identificadas con la secuencia de la proteína del grano de amaranto (Dziuba *et al.*, 2003).

Ellos encontraron que, teóricamente, en la proteína de este grano podrían estar presentes 11 diferentes actividades: antitrombótica, antiamnésica, opiáceas, inmunomoduladores, opiáceos, ligandos, inmunoestimulantes, embriotóxico, inhibidores de proteasas, antihipertensivos y antioxidantes (Figura 5). Sin embargo no se reporta actividad inhibitoria de tirosinasa.

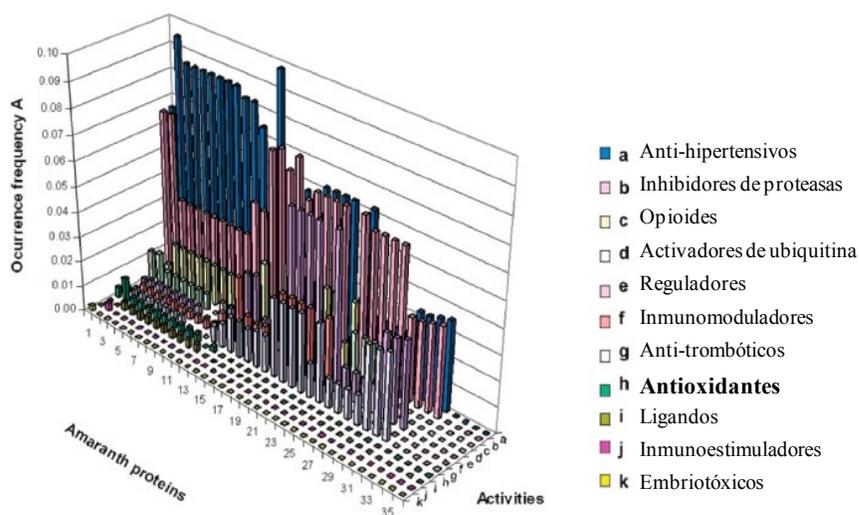


Figura 5. Predicción de posibles bioactividades presentes en la secuencia de la proteína del grano de amaranto y la frecuencia con la que se presentaría cada una de ellas.

En pruebas experimentales se reporta la presencia de péptidos antihipertensivos y péptidos antioxidantes que se obtuvieron al hidrolizar a la proteína del grano de amaranto con alcalasa (Tovar *et al.*, 2009).

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*) genera una gran cantidad de residuo lignocelulósico, a partir del cual se puede obtener principalmente fibra insoluble, que a su vez es fuente de compuestos polifenólicos (Tabla 3), los cuales se liberan de la lignina y azúcares a través de una hidrólisis ácida. Los compuestos polifenólicos presentan actividad antioxidante que al añadirse al mismo residuo lignocelulósico podría incrementar esta actividad (Arce, 2011).

Tabla 3. Polifenoles totales presentes en las diferentes partes de la planta de amaranto.

Polifenoles Totales (mg EAG/g)		Hoja	Tallo
Extracto	A	12.55±0.8	1.62±0.01
	FO	15.33±0.34	55.68±0.56
	FA	101.53±1.61	57.99±0.93
Total		129.41	115.29

1. 7. Importancia de polifenoles en la actividad inhibitoria de tirosinasa

El polvo de corteza del tallo de *Hesperethusa crenulata* sin. *Naringi crenulata* y *Acidissima limonia*, especies comunes de plantas tropicales en el subcontinente indio y el sureste asiático, se ha utilizado tradicionalmente como un tratamiento para blanquear la piel. El uso del extracto de diclorometano presentó un valor de IC₅₀ de 0.546 mg/ml. Este valor IC₅₀ fue aproximadamente 60 veces mayor que para el ácido kójico (0,0009 mg/ml), un inhibidor de la tirosinasa estándar comúnmente usado en formulaciones de cosméticos y alimentos (Wangthong *et al.*, 2010).

Así como el ejemplo anterior se han usado extractos de las diferentes partes de plantas como: *Mukorossi sapindus*, *Magnolia denudata*, *M. denudata* var. flores *purpurascens*, *Polygonatum odoratum*, *Ampelopsis japónica* y *Citrus grandis* que inhiben la tirosinasa hasta en un 90,8%, similar a la referencia de ácido kójico (95%), en 10 mg/ml (Wu *et al.*, 2010).

Los extractos de las *Elegans dalea*, *Molleoides lithrea*, *Greyia flanaganii*, *Cochinchinensis cudrania*, y *Racemosum distylium* podrían ser los inhibidores de tirosinasa más activos de fuentes naturales. Todos los estos extractos mostraron flavonoides como los principales constituyentes. Esta clase de compuestos naturales es el grupo más grande de inhibidores de tirosinasa. Varios estudios han demostrado que el número y posición de grupo de hidroxilo del anillo B, así como los sustituyentes juegan un papel clave en la actividad inhibitoria de la tirosinasa. Los grupos hidroxilo en los compuestos llevan a cabo el ataque nucleófilico sobre los átomos de cobre en el sitio activo de la enzima y están directamente involucrados en la transferencia de protones durante la catálisis, que da lugar a la inactivación de la tirosinasa.

Con respecto al impedimento estérico de grupo prenilo, azúcares, o de la cadena alquilo, todos estos sustituyentes podrían estar obstaculizando la entrada del inhibidor con el sitio activo de la enzima. Se ha demostrado que *Steppogenin*, *Artocarpesin*, *Norartocarpetin*, *Artocarpanone*, *Isoartocarpesin*, *Dalenin*, y *Kurarinol* fueron los compuestos naturales más activos con valores de IC₅₀ que van 0.1-1.54 μM.

1. 8. Importancia de la actividad antioxidante en la actividad inhibitoria de tirosinasa

Los efectos inhibidores de algunos extractos crudos de cáscaras de cítricos, mostraron que pueden inhibir *in vitro* la melanogénesis en células con melanoma, atribuyendo la actividad inhibitoria a la actividad antioxidante de los frutos cítricos Zhang et al., (2007).

Un antioxidante estabiliza o desactiva los radicales libres antes que se adhieran a las células. Los seres humanos han evolucionado sistemas muy complejos de antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que trabajan sinérgicamente, y en combinación unos con otros, protegen a las células y sistemas de órganos contra los daños inducidos por radicales libres. Los antioxidantes pueden ser sustancias producidas endógenamente o ser obtenidos a partir de fuentes exógenamente por ejemplo, como parte de una dieta o de suplementos dietéticos. Un antioxidante ideal debe ser fácilmente absorbido y ser capaz de extinguir los radicales libres, así como quelar metales redox. Estas sustancias deben trabajar en soluciones acuosas y / o dominios y la expresión génica de una manera positiva. Antioxidantes endógenos juegan un papel crucial en el mantenimiento óptimo de las funciones celulares y, por tanto sistémicas de la salud y el bienestar.

1.8.1. Tipos de Antioxidantes y métodos de cuantificación

Los antioxidantes son fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo y las relaciones estructurales entre diferentes partes de su estructura química además ejercen sus propiedades protectoras previniendo la producción de radicales libres o neutralizando los producidos en el cuerpo (Morales et al., 2009).

Se conocen tres tipos principales de antioxidantes:

- Primarios. Previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.
- Secundarios. Capturan los radicales libres, evitando la reacción en cadena
- Terciarios. Reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres (Morales et al., 2009).

Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se pueden dividir en dos grandes categorías, los basados en la reacción de transferencia de átomo hidrogeno (HAT) y los basados en las reacciones de transferencia de un solo electrón (ET). Los últimos involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del final de la reacción, mientras que los métodos HAT, generalmente usan un compuesto generador de radicales libres, un indicador molecular oxidable y un antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

A continuación se enlistan algunos métodos para sula evaluación de la capacidad antioxidante:

Métodos *in vitro*

- Método de inhibición de consumo de oxígeno (IUO) (Huang *et al.*, 2005)
- Inhibición de autooxidación lipídica (Huang *et al.*, 2005)
- Capacidad de absorbencia del radical oxígeno (ORAC) (Huang *et al.*, 2005)
- Método de blanqueamiento de Crocina (Huang *et al.*, 2005)
- Parámetro total de atrapamiento de radicales por antioxidantes (Huang *et al.*, 2005)
- Fenoles totales por resctivo Folin-Ciocalteau (Huang *et al.*, 2005)
- Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) (Huang *et al.*, 2005)
- Poder reductor (Yen y Chen, 1995)
- Potencial antioxidante total usando Cu(II) (Huang *et al.*, 2005)
- Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Huang *et al.*, 2005)
- Sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) (Kamal y Pokorný, 2005)

Métodos *in vivo*.

- Evaluación del efecto citotóxico (Freshney, 1982)
- Absorción de rojo neutro (NRU) (Nadhlala, 2010)
- Evaluación de oxidación de lípidos *in vivo* (El Haffidi y Baños, 1997)

1.8.1.1. Método de decoloración del radical catiónico ABTS

La capacidad de reducción del radical catiónico ABTS por las muestras se evalúa por una versión mejorada de Re-Pellegrin (1988). El ABTS⁺ que se genera por su oxidación a causa de la exposición con persulfato de potasio (K₂S₂O₈) obteniéndose el radical catiónico ABTS^{•+} o el dicatión ABTS²⁺, se caracterizan por ser un color verde-azul intenso. Este radical presenta una estabilidad química elevada, su máxima absorción UV-Visible es a 728 nm (Miller *et al.*, 1993).

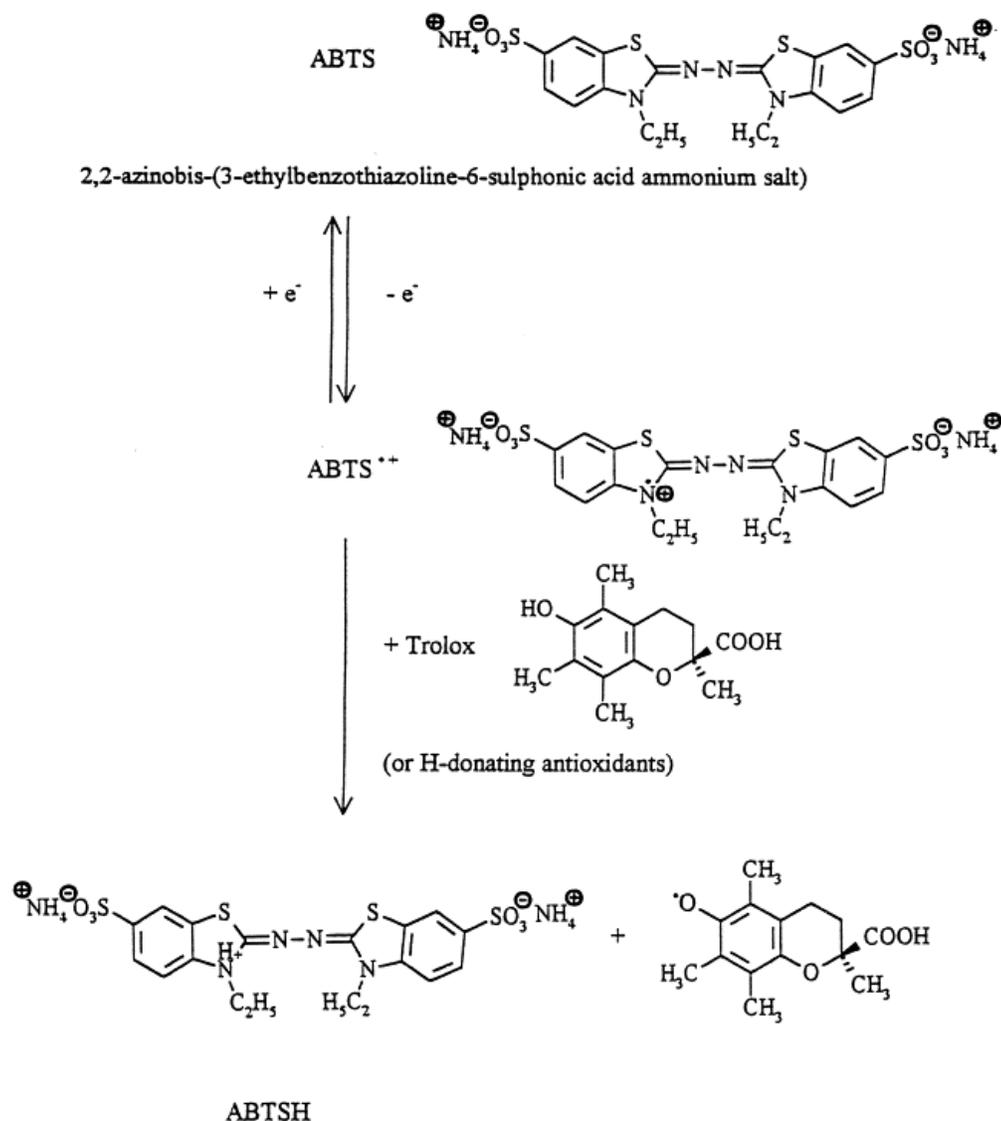


Figura 6. Formación del radical cationico ABTS, y reacción en presencia de un antioxidante (Trolox), para su estabilización.

1.8.1.2. Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•)

El DPPH• en su forma radical presenta compuesto colorido púrpura alcanzando una absorción máxima a 517 nm en espectrofotómetro de UV-Vis. En su forma reducida posterior a la presencia de antioxidantes con los radicales, el DPPH• se torna color amarillo. La reacción de reducción del radical DPPH• se observa en la Figura 11. La decoloración de este compuesto en presencia de los compuestos antioxidantes, se monitorea para determinar la concentración de antioxidantes en la muestra de estudio (Brand-Williams *et al.*, 1995).

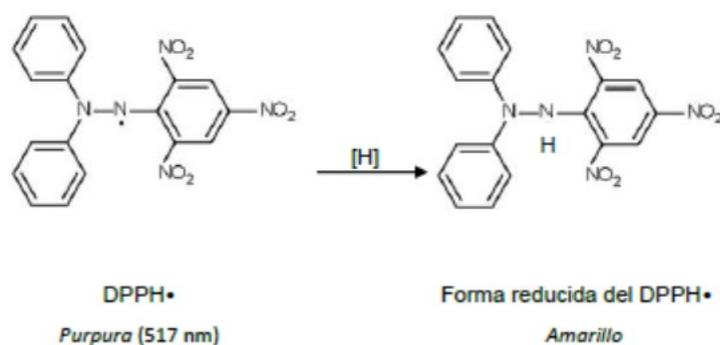


Figura 7. Reacción de reducción del radical DPPH•

1.8.1.3. Cuantificación de Polifenoles Totales por reactivo de Folin Ciocalteu

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de molibdato de sodio (25 g), tungstato de sodio (100 g), ácido clorhídrico concentrado (100 ml), ácido fosfórico al 85 % (50 ml) y agua (700 ml). Esta mezcla debe ebulir por 10 h. Después de esto se agrega sulfato de sodio (150 g) dando como resultado una solución de color amarillo intenso. La contaminación de este reactivo con reductores le confiere color verde.

Los compuestos fenólicos reaccionaron con el reactivo bajo condiciones alcalinas, por lo que la disociación de protones fenólicos dio lugar a un anión fenolato que fue capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu. Se formó un complejo azul entre el fenolato y el reactivo independientemente de la estructura del compuesto fenólico, como se observa en la Figura 9 (Huang *et al.*, 2005).

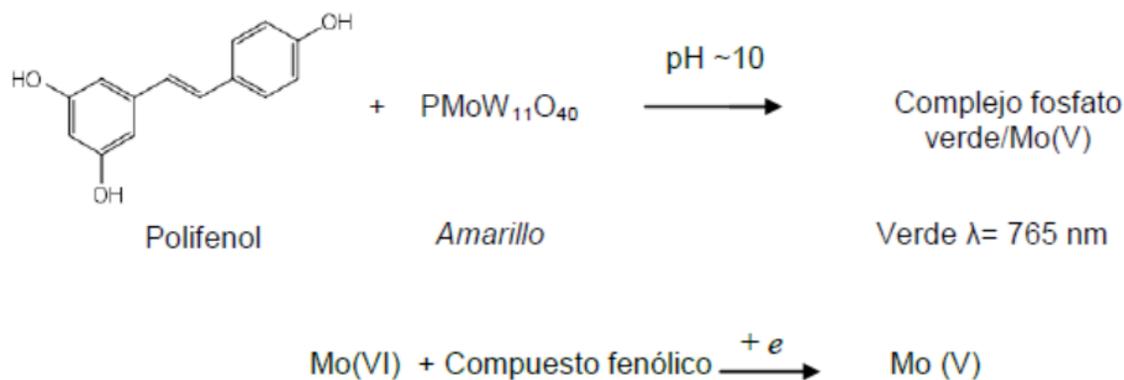


Figura 8. Reacción de los compuestos polifenólicos con el reactivo de Folin Ciocalteu.

1.8.2. Contenido de polifenoles en el muérdago

El muérdago que infesta a la zona chinampera de Xochimilco identificado como *Cladocolea loniceroides*, una especie endémica de la región, demostró que las hojas, tallos y frutos contienen polifenoles de diversa naturaleza química (Tabla 4), lo cual le confiere una gran actividad antioxidante (Serrano, 2011).

Tabla 4. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de muérdago.

Extracto	Hoja (mg eq. ác. gálico /g)	Fruto (mg eq. ác. gálico /g)	Tallo (mg eq. ác. gálico /g)
H ₂ O	93.33 ± 0.94	120.33 ± 4.2	74.53 ± 0.9
MeOH	26.33 ± 0.97	189.50 ± 4.9	31.42 ± 0.4
NaOH	4.17 ± 0.27	5.185 ± 0.2	3.59 ± 0.19

2. Justificación

Actualmente ha aumentado el interés de los alimentos que no solo nutren sino que además intervienen en las funciones biológicas del cuerpo, es decir los alimentos funcionales, particularmente en los nutricosméticos, aquellos que mantienen la salud de la piel.

Este interés es debido ya que los factores que afectan la piel como la edad, exposición a radiaciones solares, condiciones climáticas, contaminación, alimentación, etc. causan estrés oxidativo, lo cual provoca enfermedades como: manchas anormales de la pigmentación, conocidas como melanomas y cáncer, entre otras.

La industria cosmética ha buscado inhibidores de tirosinasa; para dar tratamiento a los diferentes padecimientos de hiperpigmentación de la piel; principalmente aquellos que provienen de fuentes naturales que tengan la misma eficacia que los productos de síntesis, ya que los inhibidores sintéticos como la hidroquinona presentan graves efectos secundarios.

Un número de inhibidores de la tirosinasa, que pertenecen principalmente a polifenoles obtenidos de extractos de diferentes partes de plantas, aldehídos, alquenales, ácidos, péptidos y proteínas, se han identificado a partir de fuentes naturales y sintéticas.

Por ello en este trabajo se propone investigar el uso de péptidos de las proteínas del grano de amaranto, diferentes extractos de las plantas de amaranto y muérdago como inhibidores de tirosinasa, que puedan ser usados como materias primas de alto valor agregado especialmente diseñadas para la industria cosmética o como nutricosmético.

Y por otro lado aumentar el conocimiento científico de estas plantas, incentivar el cultivo del amaranto, en el caso del muérdago dar uso a la planta parásita y lograr la conservación de los árboles.

3. Hipótesis

Debido a que la actividad inhibitoria de tirosinasa se ha relacionado con la presencia de péptidos, proteínas y polifenoles, aunado a que las proteínas del grano de *Amaranthus hypochondriacus* han mostrado tener actividad inhibitoria enzimática, y que la planta de muérdago *Cladocolea loniceroides* demostró que contiene polifenoles de diversa naturaleza química. Entonces es posible obtener compuestos de fuentes naturales como proteínas, péptidos, compuestos fenólicos, entre otros, que poseen capacidad inhibitoria de la tirosinasa.

4. Objetivo general

Evaluar y caracterizar la actividad inhibitoria *in vitro* de la tirosinasa de diversos compuestos obtenidos de productos naturales.

4.1. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de la tirosinasa de las proteínas del grano de amaranto (albúmina 1, globulina y glutelina) y sus respectivos hidrolizados, así como de los hidrolizados del material lignocelulósico del tallo amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).
- Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de la tirosinasa de extractos polifenólicos de tallo, hoja y fruto del muérdago *Cladocolea loniceroides*.
- Evaluar el valor IC_{50} de los extractos con mayor actividad inhibitoria.
- Determinar la cinética de inhibición de la tirosinasa utilizando el extracto que posea el menor valor de IC_{50} .

5. Metodología

A continuación se presenta la estrategia experimental que se siguió para la obtención de albumina 1, globulina y glutelina del grano de amaranto. La actividad inhibitoria y capacidad quelante de los hidrolizados de las proteínas de amaranto se evaluaron con los de caseína y ovoalbúmina, para conocer el comportamiento con otras proteínas. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados reportados se expresaron como un promedio de los valores \pm la desviación estándar.

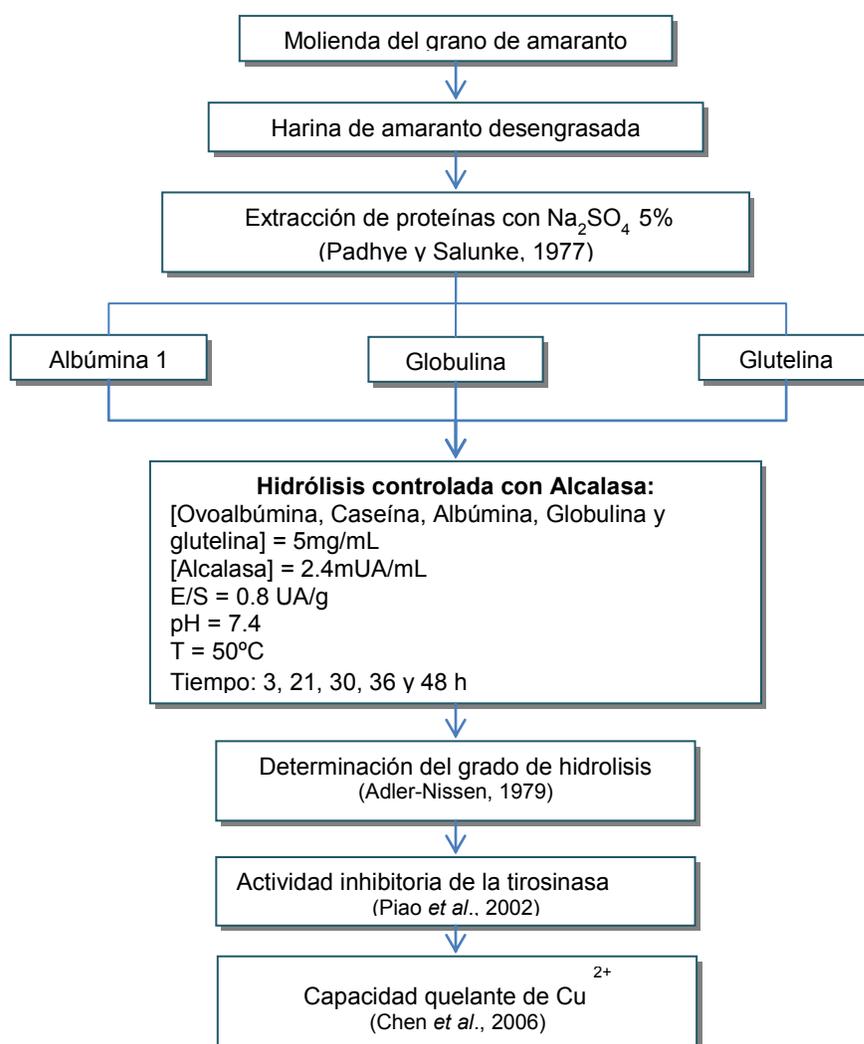


Figura 9. Estrategia experimental a seguir para la evaluación del grano de amaranto.

5.1. Desengrasado de harina de amaranto

Primero se realizó la molienda de los granos de amaranto hasta un tamaño de partícula de 0.250 mm (malla No. 60).

Para el desengrasado de la harina del grano de amaranto se adicionaron 5 ml de acetona por cada g de harina. Se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 16 h (3 repeticiones). Se filtró al vacío y se lavó posteriormente con éter. Una vez que se obtuvo la harina se colocó en campana de extracción para permitir la evaporación los solventes. Finalmente se pasó la harina a través de un tamiz con un tamaño de partícula de 0.250 mm (malla No. 60) y se mantuvo en almacenamiento a 5°C hasta ser utilizada.

5.2. Extracción de Albúmina 1 y globulina con Na₂SO₄

Se mezclaron 50 g de harina de amaranto desgrasada con 300 mL de Na₂SO₄ al 5% (0.04 M). Se mantuvo en agitación 30 min. a 5°C. Se centrifugó durante 20 min a 13000 xg. Se separó el sobrenadante y el residuo de harina, a este último se le agregaron 200 mL Na₂SO₄ al 5% mezclando durante 30 min. Se centrifugo y el sobrenadante obtenido se juntó con el primer sobrenadante. Se le adicióno una solución de (NH₄)₂SO₄ al 50, 70 y 100 % para saturar y precipitar las proteínas. Se centrifugó en cada uno de los niveles de saturación por 20 min a 13000 xg y se filtró. Se dializó el precipitado con agua durante 24 h con cuatro cambios de agua desionizada. Por último se centrifugó por 20 min a 13000 xg. El sobrenadante fue la fracción que contenía las proteínas solubles en agua (albúmina 1). El sólido contenido después de la diálisis se sometió a una segunda diálisis en solución de Na₂SO₄ al 10% durante 24 h. Por último se centrifugó por 20 min a 13000 xg. El sobrenadante fue la fracción que contenedora de la globulina.

5.3. Extracción de Glutelina con Etanol

Después de realizar la primera extracción de Albumina 1 y globulina con Na₂SO₄ al 5% (0.04 M) el residuo de harina que fue separado, se disolvió en etanol al 70% en proporción 1:10, después se separó por centrifugación 20 mín. a 13000xg, el sobrenadante se desechó y al residuo se le adiciono Tris-HCl 0.1 M hasta pH 8, nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones. El sobrenadante fue la fracción contenedora la glutelina.

5.4. Hidrólisis enzimática de Albúmina 1, globulina y glutelina con Alcalasa

En un tubo Eppendort se adicionaron 320 µl de buffer de fosfatos 0.5 M pH 7.4, seguido de 600 µl de la fracción proteica 15 mg/ml. Se incubó durante 5 min a 50 °C. Posteriormente se añadieron 80 µl de Alcalasa 2.4 mUA/ml en solución búfer de fosfatos 0.5 M con pH 7.4 a 50 °C, a la que le corresponde una relación enzima/sustrato (E/S) de 0.8 UA/g. Se realizó una hidrólisis a 50 °C en los siguientes intervalos de tiempo: 3, 21, 30, 36 y 48 h utilizando como blanco una mezcla de todos los reactivos sin ser sometido a hidrólisis. Al término de cada uno de los tiempos de hidrólisis se añadieron 100 µl de solución de fenilmetilsilfonilo (PMSF) a una concentración de 2 mg/ml en etanol para detener la reacción (Tabla 5).

Tabla 5. Orden de adición de reactivos para la hidrólisis de albúmina 1, globulina y glutelina del grano de amaranto con alcalasa.

Adición de reactivos	Volumen añadido
Búfer de fosfatos 0.5 M; pH 7.4	320 µL
Albúmina 1 (5 mg/mL)	600 µL
<i>Incubar 5 min. a 50 °C</i>	
Alcalasa 2.4 mUA/mL en búfer de fosfatos 0.5 M; pH 7.4 a 50 °C	80 µL
Tiempo de hidrólisis (1, 12, 24, 36 y 48 hrs.)	
PMSF en etanol (2 mg/mL)	100 µL

5.5. Determinación del grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1979)

Se diluyó 1:5 el hidrolizado de albumina 1, globulina y glutelina, se mezclaron 125 µl de esta en un tubo de ensaye con 1 ml de búfer de fosfatos 0.5 M de pH 8.2 y 1 ml de ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) al 0.1% en agua (Tabla 6). Se incubó en la obscuridad a 50 °C durante 1 h. Se le añadieron 2 ml de HCl 0.1 N para detener la reacción. Se dejó enfriar

durante 30 min a temperatura ambiente para finalmente leer a una longitud de onda de 340 nm.

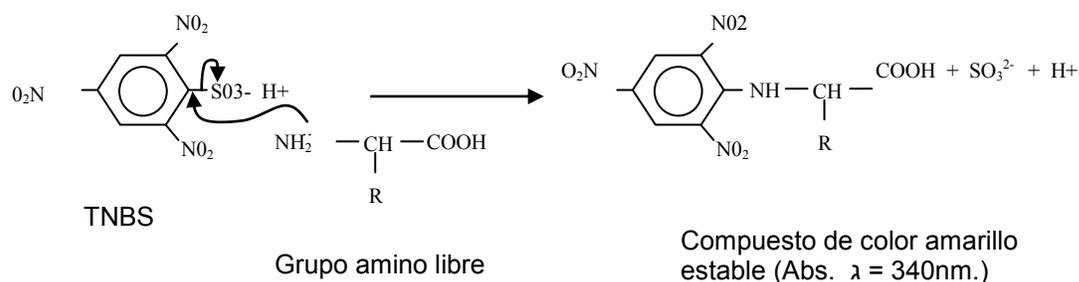


Figura 10. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis de albúmina 1 con alcalasa

Tabla 6. Orden de adición de reactivos para la determinación de grado de hidrólisis (GH) de albumina 1 del grano de amaranto.

Adición de reactivos	Volumen añadido
Curva patrón de leucina: $y = 0.361x + 0.0647$	
De la dilución tomar	125 μL
Búfer de fosfatos 0.5 M; pH 8.2	1 mL
TNBS (0.1 % en agua)	1 mL
<i>Incubar 1 h a 50 °C en la oscuridad</i>	
HCl 0.1 N	2 mL
<i>Leer en frío a 340 nm</i>	
NOTA: Orden de adición de los reactivos para el blanco de lectura: Alcalasa-PMSF-albúmina 1.	

5.6. Hidrolisis ácida del tallo de Amaranto

Los compuesto fenólicos y oligosacáridos de las diferentes partes de la planta de amaranto son liberados mediante una hidrolisis acida. La harina del tallo de amaranto (HTA) se colocó en tubos de ensaye y se mezclaron con ácido sulfúrico 5% (v/v) en una relación 1:16 (p/v). Se colocaron en estufa a 120°C, 110°C, 100°C y 90°C durante 30, 60, 90, 120,150 mín. Para obtener compuestos fenólicos. Posteriormente se filtraron. Los hidrolizados resultantes se neutralizaron (pH 7) con una solución 4N de NaOH. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 10mín. los residuos se desecharon y el sobrenadante se guardó a 4°C. A los hidrolizados obtenidos se realizó la cuantificación de polifenoles totales.

5.7. Extracción de polifenoles totales de muérdago

La extracción de la fracción de polifenoles totales de frutos maduro y verde, hoja y tallo se llevó a cabo por los siguientes métodos:

-Extracción por solventes. Se utilizaron 5 solventes: etanol, metanol, acetato de etilo, hexano y cloroformo, de acuerdo a la metodología propuesta por MiliusKas *et al.*, 2004. La extracción se llevó a cabo en 2 pasos. Se tomaron 0.5 g de muestra seca con 10 ml de solvente y se mantuvo en agitación durante 1 h. Concluido este tiempo, se centrifugo la muestra para separar el solvente del sólido y se adicionaron de nuevo 10 ml de los solventes y se mantuvieron en agitación 1 h. Se combinaron los extractos y evaporados a sequedad. Por último la muestra se redisolvió en DMSO al 5 %.

-Para la extracción con agua, se calentaron 25 ml de agua hasta ebullición y se agregaron 0.5 g de muestra, dejando ebullicir durante 5 mín. para separar los sólidos, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 3 mín.

- A las muestras anteriores se realizó la cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante.

En la Figura 8, se muestra el esquema general para la obtención de los extractos, así como los análisis posteriores que se realizaron a los mismos.

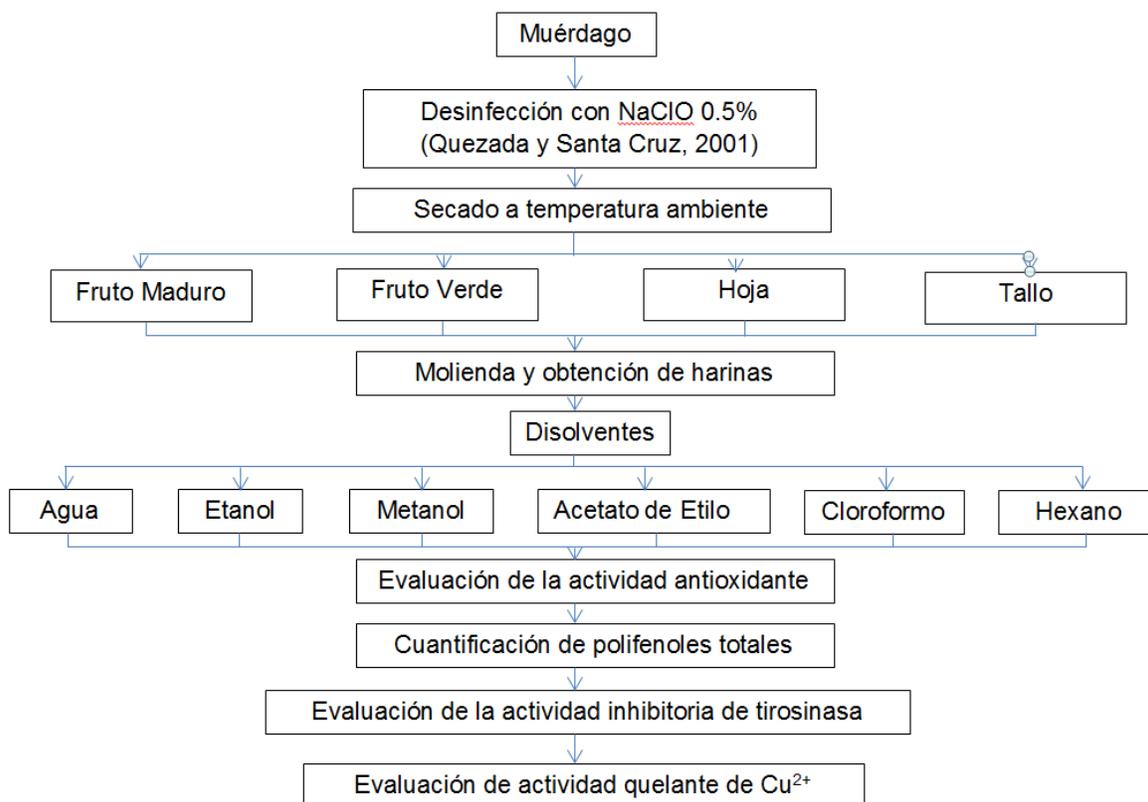


Figura 11. Estrategia para obtener los extractos de muérdago.

5.8. Cuantificación de polifenoles totales

Los compuestos fenólicos fueron cuantificados, por el método de Folin Ciocalteu. El método midió el contenido total de polifenoles.

La mezcla de reacción consistió de 500 μ l de muestra con 4.5ml de agua, se agregaron 200 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y 500 μ l de solución saturada de Na_2SO_4 , se agitaron los tubos y se adicionaron por último 4.3 ml de agua destilada: Se leyó la absorbencia a 725 nm después de 1 h de reposo en la obscuridad. El contenido total de polifenoles fue calculado en equivalentes de ácido gálico.

Para determinar el rendimiento de las extracciones, se cuantificaron los polifenoles de cada muestra por el método de Folin-Ciocalteu. Se evaluó la concentración de polifenoles totales en todas las muestras obtenidas por los distintos métodos de extracción.

5.9. Método de decoloración del radical catiónico ABTS

Se mezcló una solución 7 mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio en agua, se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 h hasta obtener una solución azul oscuro intenso. Se diluyó en agua teniendo un volumen total de 3 ml, hasta alcanzar una absorbencia de 0.7 leído a 734 nm. Esta solución se mezcló con 70 µl de la muestra. La absorbencia se monitoreo por cada minuto, por un tiempo total de 6 min a 30°C. La capacidad de reducción de radicales se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{A_{C(0)} - A_{A(t)}}{A_{C(0)}} \times 100$$

$A_{C(0)}$ = Absorbancia del control negativo en el momento de preparación de la solución

$A_{A(t)}$ = Absorbancia de la muestra después de 45 min

5.10. Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•)

La capacidad de reducción del DPPH• por las muestras fue evaluada según Brand-Williams (1995).

Se mezcló 300 µl de solución de DPPH• en metanol (0.5 mM) con 500 µl de la muestra. Se adicionan 3.0 ml de metanol. La cinética de decoloración se monitorea a 517 nm por un tiempo exacto de 45 minutos. El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente ecuación.

$$\% \text{Inhibición} = \left[\frac{(AC_{(0)} - AA_{(t)})}{AC_{(0)}} \right] \times 100$$

$AC_{(0)}$ = Absorbancia del control negativo en el momento de preparación de la solución.

$AA_{(t)}$ = Absorbancia de la muestra después de 45 min.

5.11. Actividad quelante de Cu²⁺

La actividad quelante de Cu²⁺ se evaluó con trimetil-murexida (TMM) que es un agente quelante. El análisis quelante de Cu²⁺ se realizó con un mililitro de la disolución muestra, a la cual se le adiciono 1 ml de buffer de hexamina 20 mM que contenía 20 mM KCl y 3 mM

CuSO₄, después se adiciono 0.25 ml de 1 mM de tetrametil murexida (TMM). Se midió la absorbencia a 485 y 530 nm.

5.12. Actividad inhibitoria de la tirosinasa

El experimento se llevó a cabo agregando 80 µl de buffer de fosfato de potasio 0.067 M (pH 6.8), 40 µl de 5 mg/ml L-tirosina disuelta en búfer de fosfato de potasio 0.067 M (pH 6.8), 40 µl de las diferentes concentraciones de inhibidor en solución al 5 % de DMSO, y 40 µl de 480 U/ml de solución de tirosinasa de champiñón. El volumen final de cada tubo es de 200 µl, que contiene 1 mg/ml de [Sustrato], 96 U/ml de [Enzima], y diferentes concentraciones de [Inhibidor], que van desde 1 µM a 10µM.

El control negativo, fue el tubo en donde los inhibidores se sustituyen con una solución de DMSO al 5 % y se ajustaron a un volumen total de 200 µl.

El control positivo es HQ (Hidroquinona), la cual se probó en paralelo con los hidrolizados en las mismas concentraciones y mismas condiciones (Piao *et al.*, 2002).

La mezcla de ensayo se debe incubar a 37°C. La densidad óptica de las mezclas de reacción, que se correlaciona con el cantidad de dopacromo producido, se mide a 475 nm en períodos de 1 min durante 10 min.

La estrategia que se siguió para determinar la actividad inhibitoria de la tirosinasa *in vitro* se muestra en la Figura 12.

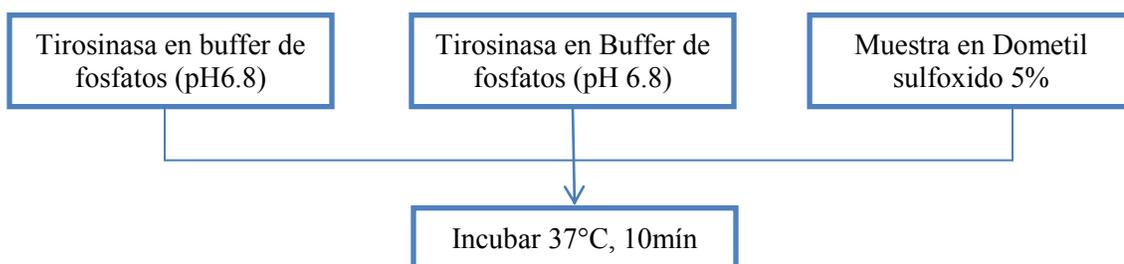


Figura 12. Estrategia experimental para determinar el grado de inhibición de la tirosinasa por la acción de los hidrolizados de albúmina 1, globulina y glutelina.

El porciento de inhibición de la tirosinasa será calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{[(A - B) - (C - D)]}{(A - B)} \times 100$$

Dónde:

A: Blanco al final de la incubación

B: Blanco al inicio de la incubación

C: Hidrolizado en solución al final de la incubación

D: Hidrolizado en solución al inicio de la incubación

5.13. Estudio de la cinética

La cinética de inhibición se estudió por el método gráfico de Lineweaver y Burk (doble-recíproco). Con el mismo protocolo utilizado en el "ensayo enzimático de la actividad de la tirosinasa," usando las siguientes concentraciones de L-tirosina 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml. Las velocidades de reacción (V) se midieron cada min durante 10 min y sin un inhibidor en la parte lineal de la cinética (tasas iniciales) donde la cantidad de sustrato no es el parámetro limitante. Los resultados se analizan de acuerdo con la representación de Lineweaver y Burk método que permite la determinación de la constante de Michaelis (Km) y velocidad máxima (V_{máx}). La constante de inhibición (K_i) se calcula como sigue, donde [I] y [S] son la concentración de inhibidor y el sustrato, respectivamente.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right\} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

5.14. Medición del IC₅₀

El valor IC₅₀ se define como la concentración de péptido o extracto en [mg/ml] requerida para inhibir 50% de la actividad de la Tirosinasa en las condiciones descritas. Se determinó por análisis de regresión lineal de % inhibición de la Tirosinasa versus concentración de extracto [mg/ml]

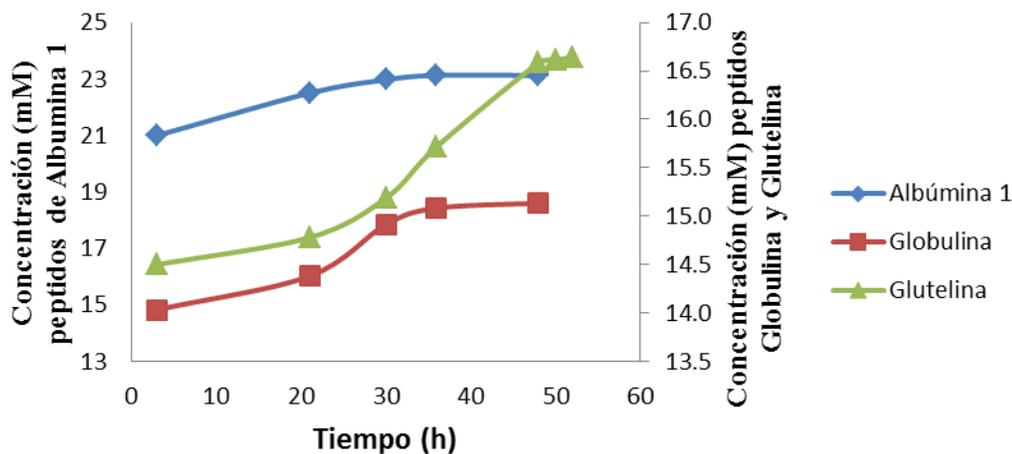
6. Resultados y Discusión

6.1. Evaluación de la planta de amaranto

6.1.1. Evaluación de las proteínas del grano de Amaranto

6.1.1.1. Hidrólisis enzimática de las fracciones proteicas con alcalasa.

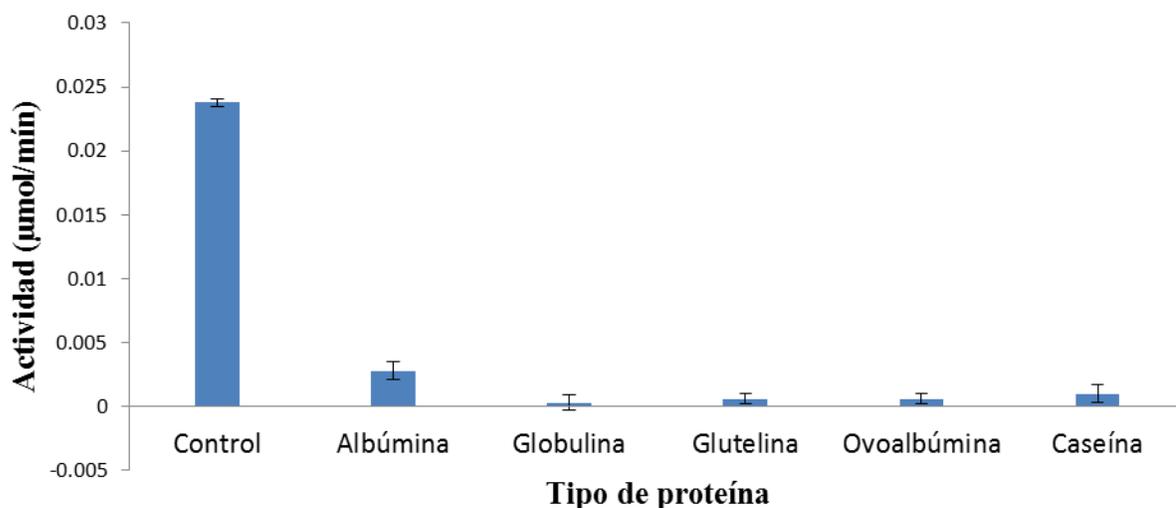
Al evaluar el grado de hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto (Gráfica 1) se encontró el siguiente orden Albúmina1>Glutelina>Globulina, estos resultados son consistentes con los obtenidos por Tovar *et al.*, 2009. Siendo la Albúmina 1 la que presenta el mayor grado de hidrólisis a las 48 h. (Para la determinación de concentración del grado de hidrólisis ver apéndice A).



Gráfica 1. Grado de hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto.

6.1.1.2. Evaluación de diversas proteínas como sustrato de tirosinasa.

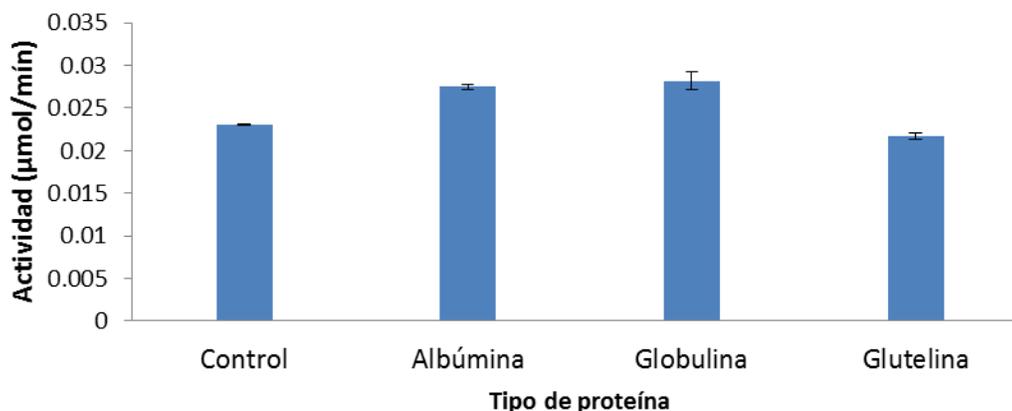
A continuación se presenta la evaluación de las proteínas de amaranto y otras proteínas control (Ovoalbúmina y Caseína) como sustituto del sustrato (L-Tirosina) de la tirosinasa (Gráfica 2). En esta evaluación se encontró que la Tirosinasa no tiene actividad significativa en esas condiciones, por lo tanto la tirosinasa no utiliza como sustrato esas proteínas y se esperaría que dichas proteínas actuaran como inhibidores de la enzima.



Gráfica 2. Proteínas como sustrato de tirosinasa..

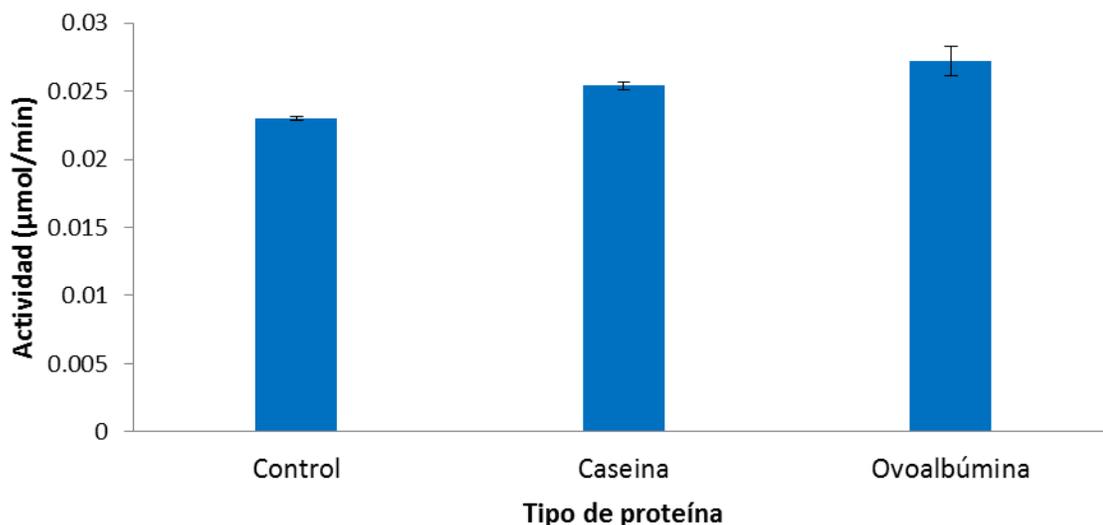
6.1.1.3. Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por las proteínas del grano de amaranto y proteínas control

Los resultados muestran que las proteínas del grano del amaranto no tienen actividad inhibitoria de la tirosinasa (Gráfica 3), ya que al evaluar la actividad se observa el efecto contrario, es decir el de activación, principalmente en albúmina 1 y globulina. En el caso del control con Hidroquinona (HQ) después de los 10 min de incubación no se registró formación de dopacromo, por lo que a concentración de 1mg/ml la HQ inhibe al 100% la actividad de la tirosinasa.



Gráfica 3. Evaluación de actividad inhibitoria de las Proteínas de amaranto.

Al ver que las proteínas de amaranto tienen un efecto de activación sobre la tirosinasa, se evaluaron otras proteínas, para conocer si se tiene el mismo efecto. Como se puede ver en los resultados (Gráfica 4), la caseína y la ovoalbúmina tiene el mismo efecto de activación, por lo que no son considerados como inhibidores de la tirosinasa.

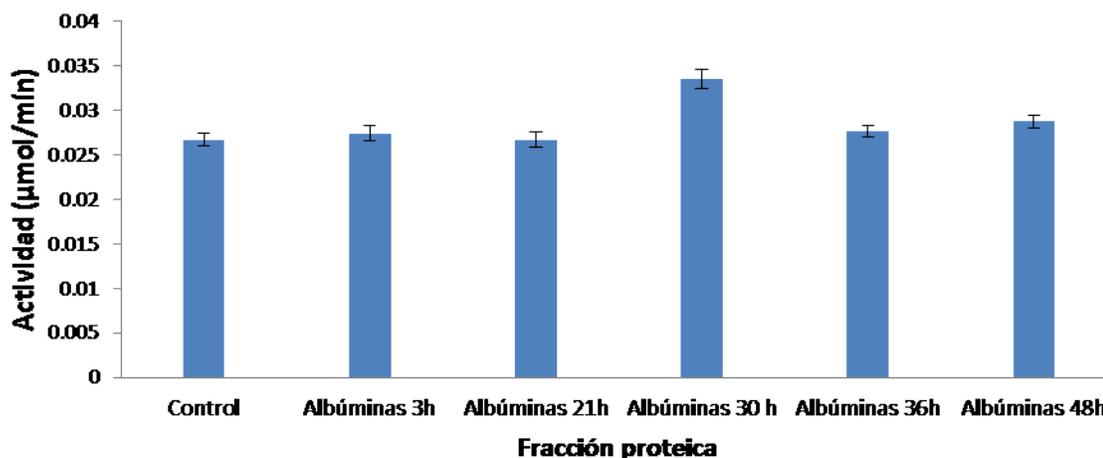


Gráfica 4. Evaluación de actividad inhibitoria de caseína y ovoalbúmina.

Esto puede indicar que estas proteínas pueden tener varios residuos de tirosina y triptófano, ya que de acuerdo a estudios previos con péptidos, se ha visto que estos residuos de aminoácidos promueven la activación de la tirosinasa.

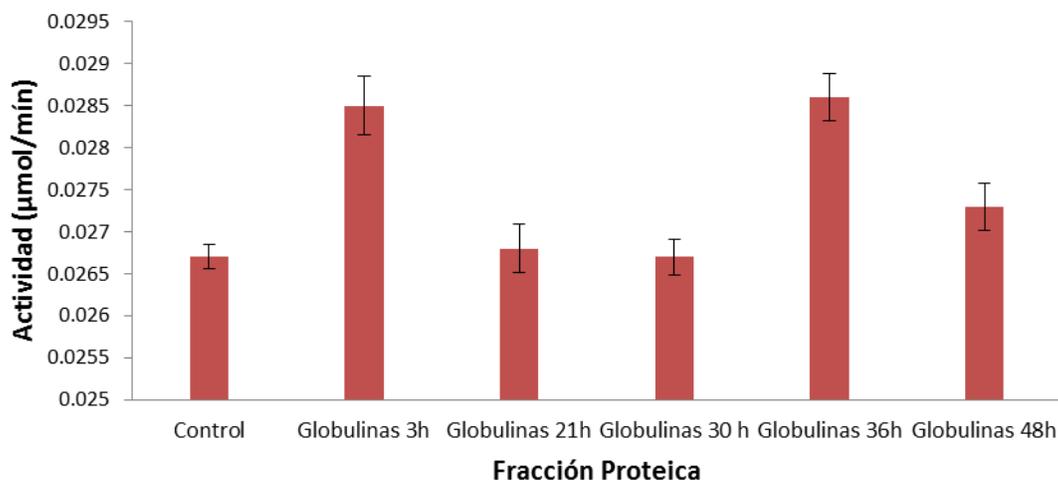
6.1.1.4. Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por hidrolizados de las proteínas de amaranto.

Una vez evaluadas las proteínas, también se evaluó el efecto de los hidrolizados proteínicos, para el caso de la Albúmina 1, se encontró que no hay efecto de inhibición, incluso para los hidrolizados de 30 h, se observa un efecto de activación sobre la tirosinasa (Gráfica 5).



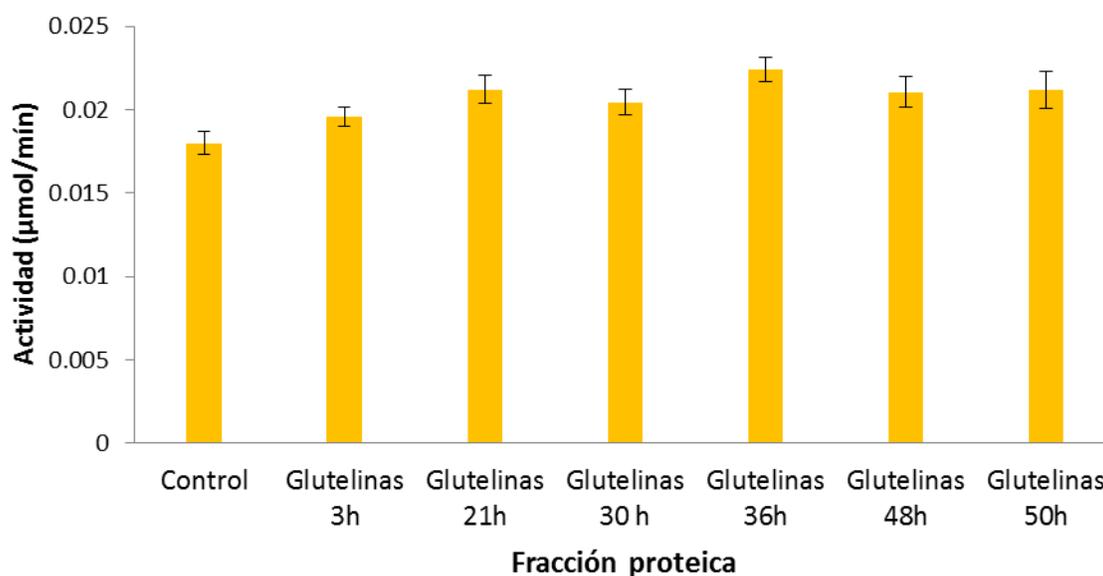
Gráfica 5. Evaluación de actividad inhibitoria de hidrolizados de Albumina 1 de Amaranto.

En el caso de los hidrolizados de globulina (Gráfica 6), tampoco mostraron actividad inhibitoria de tirosinasa, para los hidrolizados de 3, 36 y 48 h, se muestra activación significativa de la actividad de la enzima.



Gráfica 6. Evaluación de actividad inhibitoria de hidrolizados de Globulina de Amaranto.

Con las glutelinas ocurre lo mismo (Gráfica 7), no hay actividad inhibitoria, en los hidrolizados de 21 y 36 h se observa la mayor actividad de la tirosinasa.



Gráfica 7. Evaluación de actividad inhibitoria de hidrolizados de Glutelina de Amaranto.

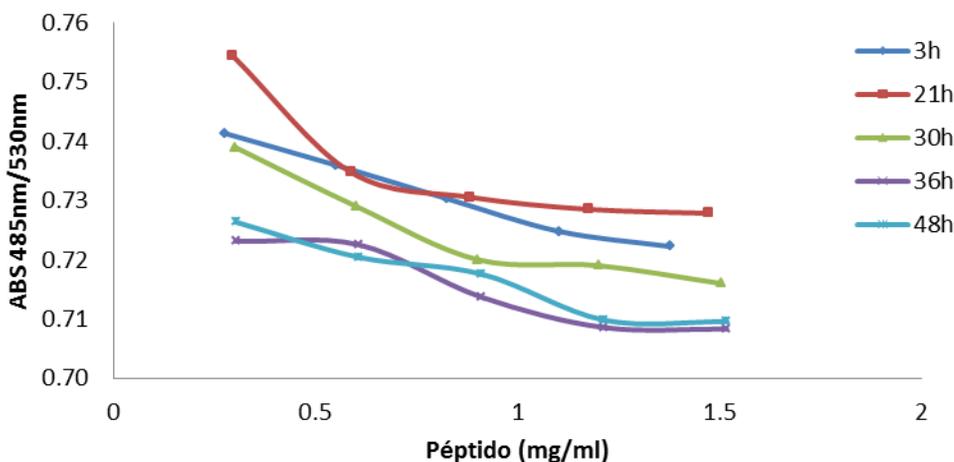
Los hidrolizados obtenidos de las proteínas de amaranto, tienen en su composición gran cantidad de péptidos con unión a la tirosinasa, ya que se obtuvo la activación de la tirosinasa. La presencia de residuos de Arg, Phe, Tyr y Trp son oxidados por la tirosinasa y por lo tanto la formación de quinonas no se ve afectada, dando a la formación de dopacromo (Schurink, 2006).

Ciertos péptidos (Park *et al.*, 1998) que incluyen residuos de tirosina pueden inhibir la tirosinasa y así facilitar la reducción de las alteraciones de pigmentación más visibles en la piel. Esos péptidos se comportan como inhibición competitiva, es decir la inhibición de la oxidación de la L-DOPA por la tirosinasa. Lo cual podría indicar que para el caso de los hidrolizados de las proteínas de amaranto, no solamente se tienen residuos de Tyr sino que también tienen residuos hidrófobos con estructuras químicas similares a las del sustrato de la tirosinasa.

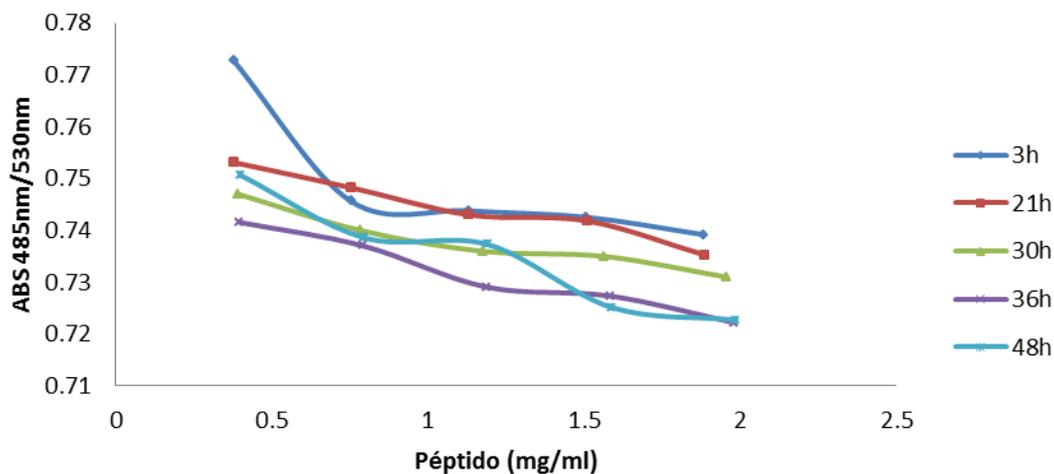
6.1.1.5. Capacidad quelante de Cu^{2+} de hidrolizados de las proteínas de amaranto

Al medir la capacidad quelante de Cu^{2+} de los hidrolizados de albúmina 1 (Gráfica 8), globulina (Gráfica 9) y glutelina (Gráfica 10) se observó que al ir aumentando la cantidad de

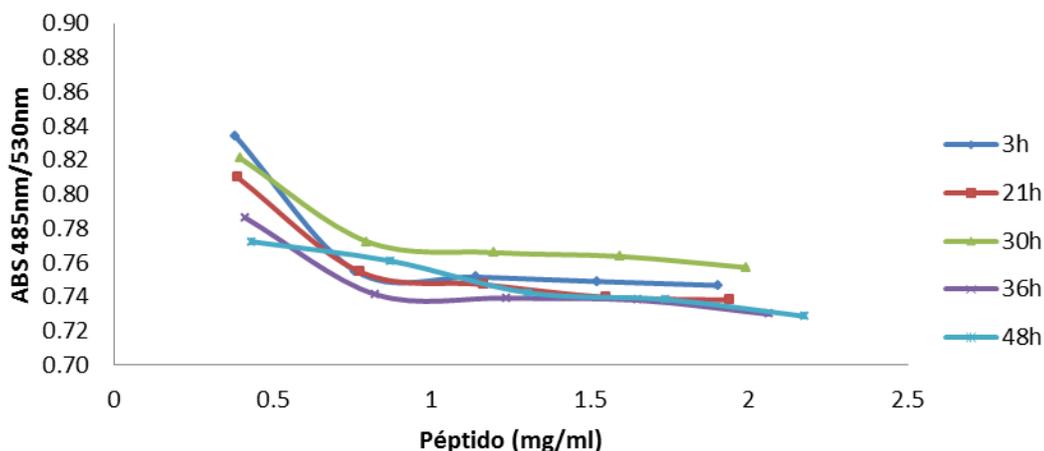
péptido disminuyó la relación $ABS_{485\text{ nm}}/ABS_{530\text{ nm}}$, indicando que la cantidad del complejo Murexida- Cu^{2+} es menor, por lo que los hidrolizados son capaces de quelar el Cu^{2+} y la formación del complejo Péptido- Cu^{2+} es mayor; sin embargo la capacidad quelante de Cu^{2+} no fue suficiente para inhibir la actividad de la tirosinasa.



Gráfica 8. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de Albumina 1 de Amarantho.



Gráfica 9. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de globulina de Amarantho.



Gráfica 10. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de glutelina de Amaranto.

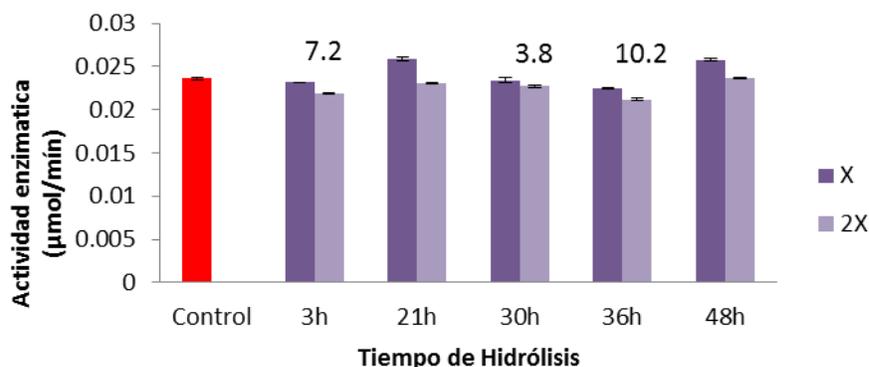
Conociendo que la tirosinasa es un complejo de proteínas bifuncional de cobre, la inhibición de la actividad de la tirosinasa se podría determinar mediante la capacidad de quelante de cobre en la enzima (Kubo y Kinst-Hori, 1999; Chen *et al.*, 2006).

Los resultados demostraron que los hidrolizados de las proteínas de amaranto a altas concentraciones tienen mejor capacidad quelante de cobre, incluso mejor que la reportada por Chen *et al.*, (2006) usando péptidos del Kefir (1.64 ± 0.11 y 1.33 ± 0.11).

En este caso los resultados obtenidos no fueron consistentes con el ensayo de la tirosinasa, con lo cual no podría asegurarse que la capacidad quelante de cobre fuera un factor determinante en la actividad inhibitoria de la tirosinasa y de esta forma lograr la inhibición en la síntesis de melanina.

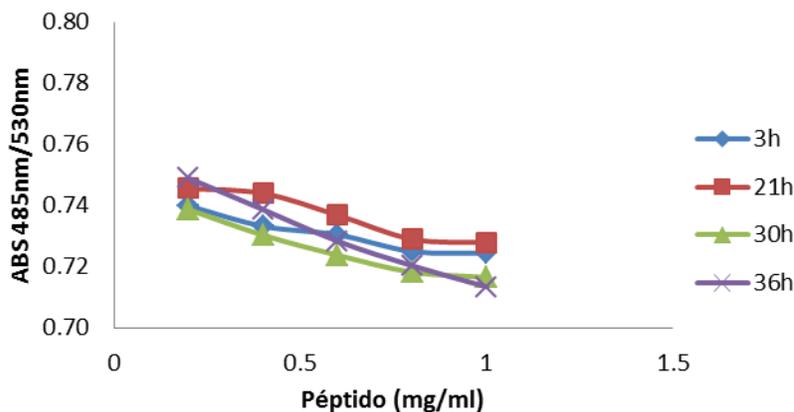
6.1.1.6. Evaluación de los hidrolizados de Ovoalbúmina y Caseína

Los hidrolizados de otras proteínas (Ovoalbúmina y caseína) tuvieron el mismo efecto, es decir no tienen la capacidad de inhibir la tirosinasa, incluso se observa que para los hidrolizados de ovoalbúmina de 21 y 48 h (Gráfica 11), se tuvo capacidad de activación de la tirosinasa.



Gráfica 11. Evaluación de la actividad inhibitoria de tirosinasa de hidrolizados de ovoalbúmina.

Pero al duplicar la concentración de péptido (0.37-0.41 mg/ml) de los hidrolizados de ovoalbúmina, en algunos casos se observa descenso en la actividad de la enzima, lo cual coincide con la evaluación de la capacidad quelante de Cu^{2+} (Gráfica 12), ya que a concentraciones superiores se observa mejor efecto de quelación de ion.



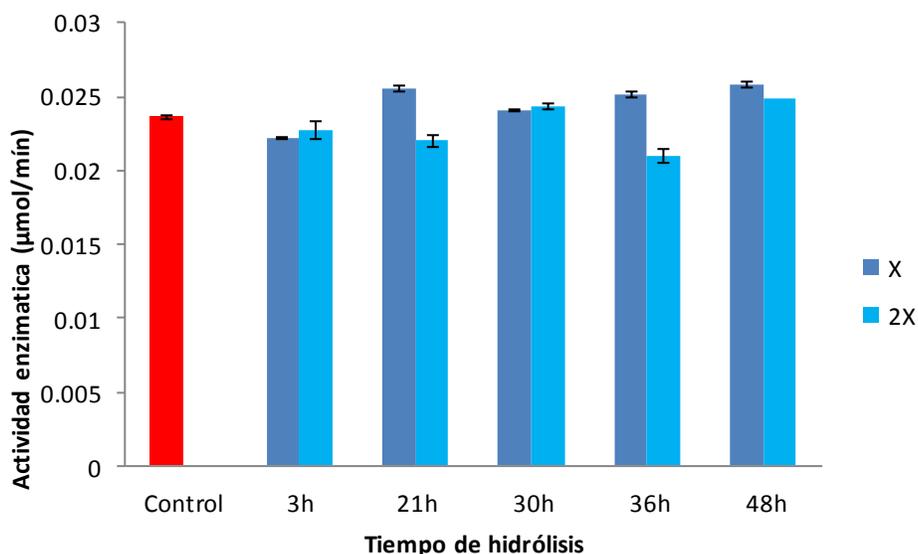
Gráfica 12. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de ovoalbúmina.

Los hidrolizados de ovoalbúmina de 3, 30 y 36 h lograron inhibir la actividad de la tirosinasa en 7.2 ± 0.21 , 3.8 ± 0.45 y 10.2 ± 0.33 % respectivamente. Resultados similares se presentaron (Schurink, 2006), para péptidos de ovoalbúmina con las siguientes secuencias peptídicas VVRFDKLP, IIRNVLQP y QINKVVERF; dichas secuencias contienen residuos de Asp y/o Glu, Arg, Tyr y Val, por lo que fueron considerados como péptidos de unión e inhibición a tirosinasa; sin embargo solo se logró inhibir el 11.3 ± 5.33 , 15.9 ± 2.45 y 20.1 ± 7.45 %. Por lo que los hidrolizados antes mencionados de ovoalbúmina podrían tener dentro de su

conformación residuos de Val, Arg y/o Phe, que le dieran esa propiedad de unirse e inhibir la tirosinasa.

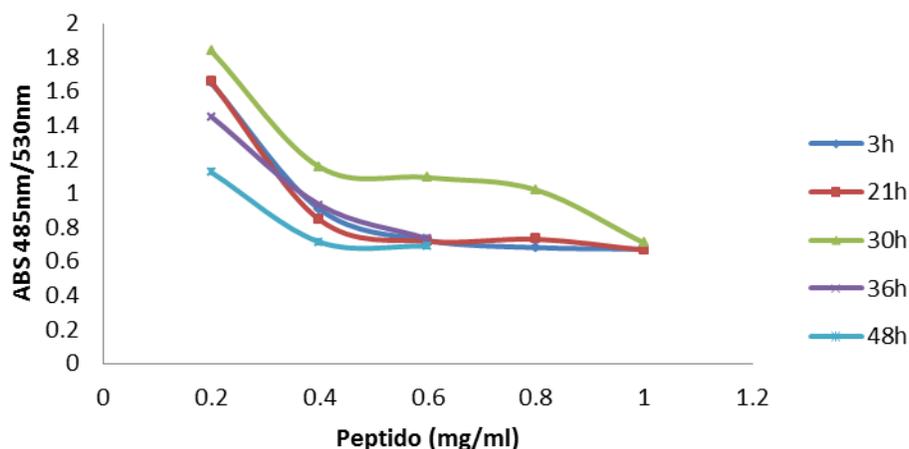
De la misma forma podría ocurrir lo mismo con los hidrolizados de caseína (Gráfica 13), ya que al duplicar la concentración de péptido (0.36-0.48 mg/ml), se observa inhibición de la enzima en los hidrolizados de 3, 21 y 36 h, logrando inhibir la actividad en 5.9 ± 0.94 , 6.8 ± 1.2 y 11.0 ± 1.89 %.

Los resultados obtenidos por Schurink, (2006); solo reportan un péptido de β -Caseína (VRGPFPII) que inhibe 9.86 ± 1.98 % la actividad.



Gráfica 13. Evaluación de la actividad inhibitoria de tirosinasa de hidrolizados de caseína.

La inhibición podría estar muy relacionada con la capacidad quelante de cobre, ya que como se muestra en los resultados (Gráfica 14) la capacidad quelante mejora al aumentar la concentración.



Gráfica 14. Evaluación de capacidad quelante de hidrolizados de caseína.

6.1.1.7. Perfil de elusión del hidrolizado de Albúmina 3h en Sephadex G-15

Debido a que los hidrolizados de las proteínas de amaranto mostraron activación de la tirosinasa se procedió a separar las distintas fracciones peptídicas, por filtración en gel de todos los hidrolizados de las 3 proteínas de amaranto.

Obteniéndose los perfiles de elusión de cada uno de ellos (Figura 13), se identificaron las fracciones y a cada una de ellas se les evaluaron la actividad inhibitoria de la tirosinasa y la capacidad quelante de Cu^{2+} .

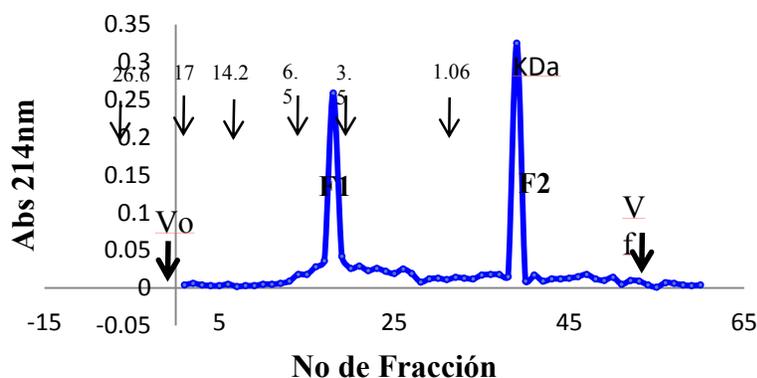
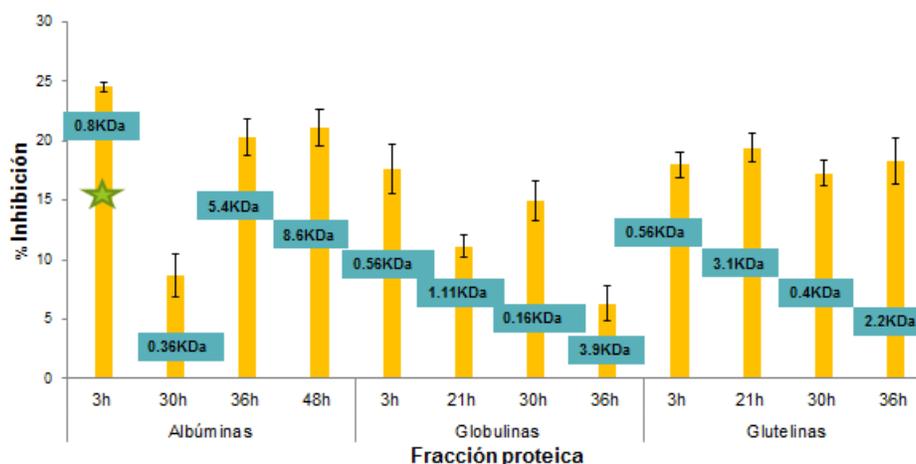


Figura 133. Cromatograma de hidrolizado de albúmina de 3h, columna de filtración en gel Sephadex G-15. Vo.- volumen vacío, Vf.- volumen total. FI.- fracción 1 del hidrolizado de albúmina de 3h ($M_r = 8.5$ kDa), FII.- fracción 2 del hidrolizado de albúmina de 3h ($M_r = 0.8$ kDa).

6.1.1.8. Fracciones peptídicas de hidrolizados de proteínas de amaranto con mayor actividad inhibitoria de la tirosinasa

En el caso de algunas de las fracciones peptídicas (Gráfica 15), se presentó actividad inhibitoria de tirosinasa, siendo la fracción de 0.8 kDa la que presentó mayor porcentaje de inhibición $25 \pm 2.29\%$ ($p \leq 0.05$).



Gráfica 15. Fracciones peptídicas de hidrolizados de proteínas de amaranto con mayor actividad inhibitoria de la tirosinasa.

En el caso de estas fracciones peptídicas al ser de menor tamaño (0.8-8.6 kDa) la probabilidad de tener residuos con Arg y/o Phe es menor y es en este caso donde se encontró inhibición de la tirosinasa, incluso mayor que la reportada por (Schurink, 2006) secuencias peptídicas de Ovoalbumin (QINKVVRF), β -Conglycinin (PFPRPQPR), Gliadin (PLGQGSFR) y Glycinin (TLNRNALR) con % Inhibición del 21.1 ± 7.45 , 4.95 ± 1.19 , 3.87 ± 0.22 y 18.3 ± 4.56 respectivamente.

Sin embargo, los resultados obtenidos al ser comparados con la referencia; el ácido kójico (95 %) un inhibidor natural (Wu *et al.*, 2010), se encontró que la inhibición obtenida está aproximadamente 4 veces por debajo. Por lo que no se consideró un buen inhibidor de la tirosinasa.

6.1.1.9. Capacidad quelante de Cu²⁺ de las fracciones peptídicas de hidrolizados de proteínas de amaranto con mayor actividad inhibitoria de la tirosinasa

Al evaluar la capacidad quelante de las fracciones de los hidrolizados de proteína de amaranto (Tabla 7), mostraron baja capacidad de quelar el ión Cu²⁺, debido a que al ir aumentando la concentración de los diferentes péptidos, el factor que relaciona la desaparición del complejo murexida-cobre y la formación del complejo péptido-Cu no disminuye de forma significativa.

Tabla 7. Factor de relación de ABS 475nm/ABS530nm de las fracciones de hidrolizados de proteína de amaranto.

Péptidos de Albúmina

Vol (ml)	3 h 0.8 kDa	30 h 0.36 kDa	36 h 5.4 kDa	48 h 8.6 kDa
0.2	1.26±0.015	1.44±0.039	1.29±0.003	1.29±0.008
0.4	1.24±0.002	1.39±0.001	1.25±0.004	1.29±0.010
0.6	1.21±0.006	1.37±0.032	1.21±0.008	1.29±0.004
0.8	1.21±0.001	1.37±0.034	1.21±0.006	1.27±0.007
1	1.19±0.002	1.33±0.022	1.20±0.030	1.26±0.006

Péptidos de Globulina

Vol (ml)	3h 0.56 kDa	21 h 1.11 kDa	30 h 0.16 kDa	36 h 3.9 kDa
0.2	1.33±0.033	1.27±0.011	1.26±0.047	1.78±0.440
0.4	1.31±0.014	1.26±0.017	1.26±0.046	1.46±0.006
0.6	1.29±0.010	1.25±0.011	1.24±0.006	1.43±0.018
0.8	1.28±0.015	1.22±0.056	1.24±0.019	1.39±0.033
1	1.27±0.013	1.20±0.074	1.23±0.024	1.30±0.013

Péptidos de Glutelina

Vol (ml)	3 h 0.56 kDa	21 h 3.1 kDa	30 h 0.4 kDa	36 h 2.2 kDa
0.2	1.24±0.016	1.27±0.016	1.44±0.003	1.27±0.004
0.4	1.22±0.010	1.27±0.016	1.44±0.001	1.27±0.008
0.6	1.22±0.018	1.25±0.005	1.39±0.015	1.26±0.36
0.8	1.20±0.007	1.24±0.013	1.38±0.003	1.25±0.018
1	0.98±0.358	1.18±0.047	1.34±0.019	1.23±0.012

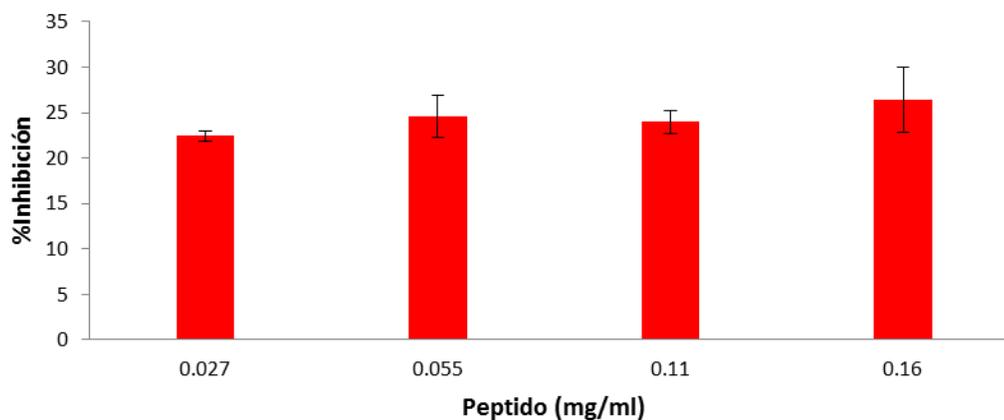
Aunque la capacidad quelante de Cu^{2+} no es dependiente de la concentración de hidrolizado, los valores obtenidos para el péptido de 0.8 kDa (1.26 ± 0.015 - 1.19 ± 0.002) fueron menores a los reportados por Chen *et al.*, (2006) (1.64 ± 0.11 y 1.33 ± 0.11).

En este caso los resultados de los péptidos de amaranto fueron consistentes con los de la actividad inhibitoria, ya que los factores de quelación de Cu^{2+} más bajos corresponden al péptido de albúmina 1 de 3 h de 0.8 kDa y a la máxima actividad inhibitoria de tirosinasa (25 ± 2.29 %) Lo mismo ocurre con lo reportado por Chen *et al.*, (2006), ya que para los péptidos del Kefir se reportan factores de quelación de Cu^{2+} de 1.64 ± 0.11 y 1.33 ± 0.11 ; con % Inhibición de 0 y 49.42 ± 4.63 respectivamente, mostrando que los péptidos que tienen los factores de quelación más bajos, tienen la mayor actividad inhibitoria.

6.1.1.10. Efecto de la concentración de hidrolizado de Albúmina (0.8 kDa) sobre el % de Inhibición de la actividad de la tirosinasa

A la fracción de 0.8 kDa de hidrolizado de albúmina de 3 h, la cual presento el mayor % de inhibición, se evaluó si era dependiente de la concentración, mostrando que al aumentar la cantidad de péptido el % de Inhibición no tiene diferencias significativas (Gráfica 16).

Mostrando que la actividad inhibitoria es independiente de la concentración de péptido.

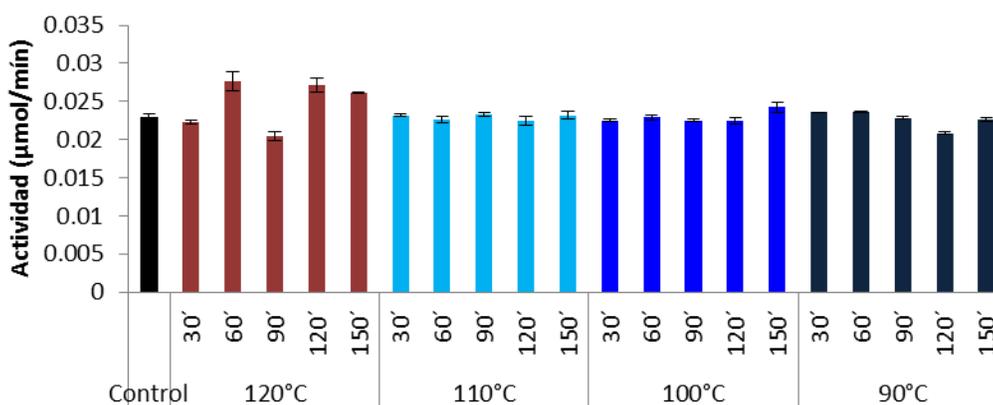


Gráfica 16. Evaluación de la concentración de péptido sobre la actividad inhibitoria de tirosinasa.

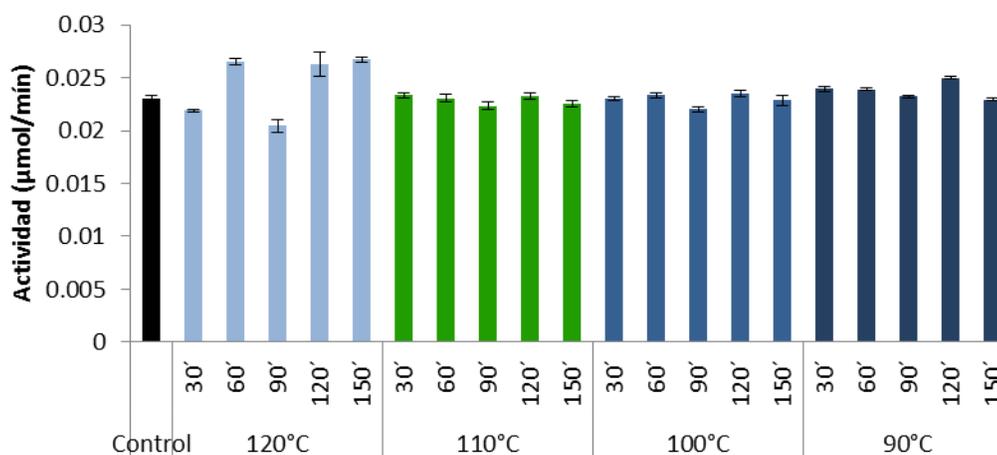
Los resultados obtenidos son consistentes con los factores de quelación de Cu^{2+} , ya que la capacidad quelante no cambio de manera significativa al aumentar la concentración de los péptidos de amaranto.

6.1.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por hidrolizados del material Lignocelulósico del tallo de amaranto.

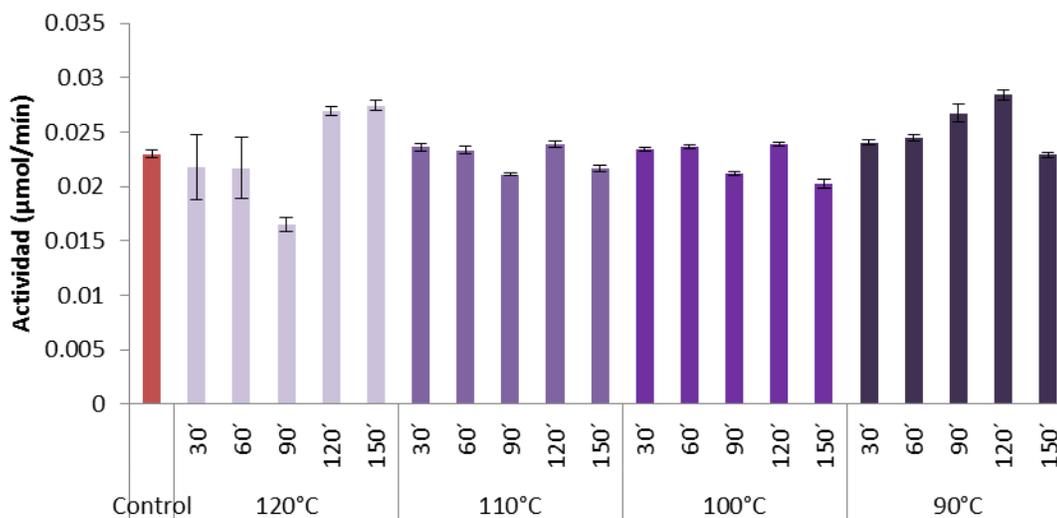
La evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa de los hidrolizados a 3 diferentes concentraciones expresadas en ácido gálico (ver apéndice D), se observan en las gráficas 17, 18 y 19. Los hidrolizados de la planta de amaranto no presentaron algún efecto sobre la actividad ($p < 0.05$).



Gráfica 17. Evaluación de la actividad inhibitoria de los hidrolizados del material lignocelulósico del amaranto a una concentración de Polifenoles de 1.25 mgeq. Ac Gálico/ml.



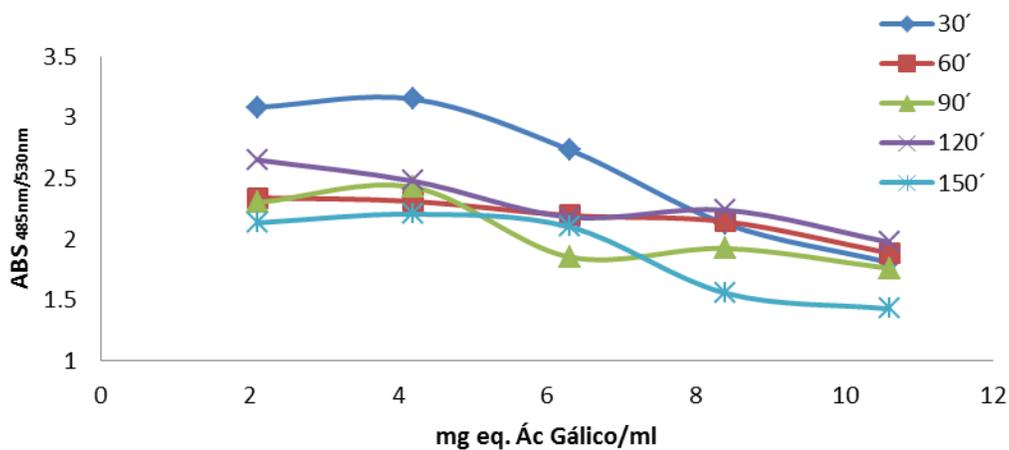
Gráfica 18. Evaluación de la actividad inhibitoria de los hidrolizados del material lignocelulósico del amaranto a una concentración de Polifenoles de 1.67mgeq. Ác. Gálico/ml.



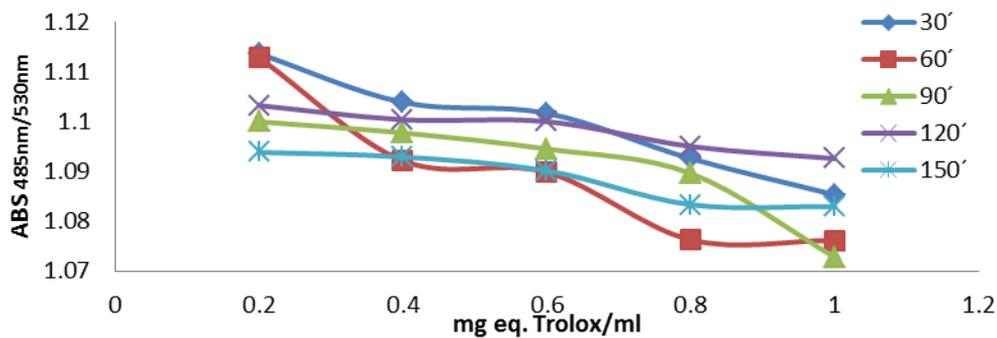
Gráfica 19. Evaluación de la actividad inhibitoria de los hidrolizados del material lignocelulósico del amaranto a una concentración de Polifenoles de 2.08 mgeq. Ác. Gálico/ml.

6.1.2.1. Evaluación de la actividad quelante sobre el ion Cu^{2+} de los hidrolizados del material lignocelulósico del tallo de amaranto

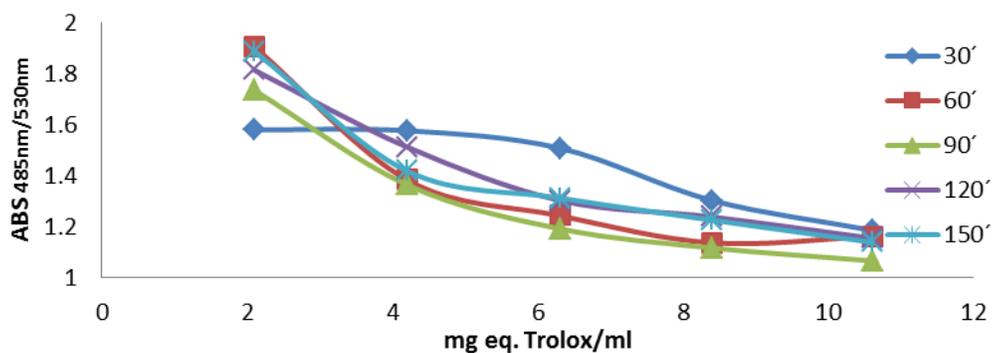
Sin embargo aunque los hidrolizados no presentaron actividad inhibitoria de la tirosinasa, mostraron tener actividad quelante pero a altas concentraciones, por lo que la concentración usada para la evaluación de la actividad inhibitoria no fue suficiente. El efecto quelante que presentaron los hidrolizados se observa por el descenso del factor de la absorbancia 485nm/530nm con respecto a la concentración de Polifenoles. En las gráficas 20, 21, 22 y 23 se muestran los resultados obtenidos de los hidrolizados a diferentes temperaturas y tiempos de hidrolisis.



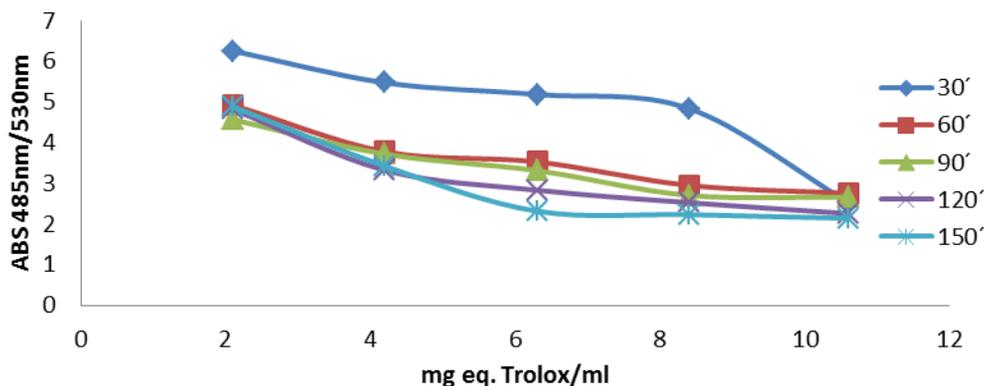
Gráfica 20. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 120°C a diferentes tiempos.



Gráfica 21. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 110°C a diferentes tiempos.



Gráfica 22. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 100°C a diferentes tiempos.

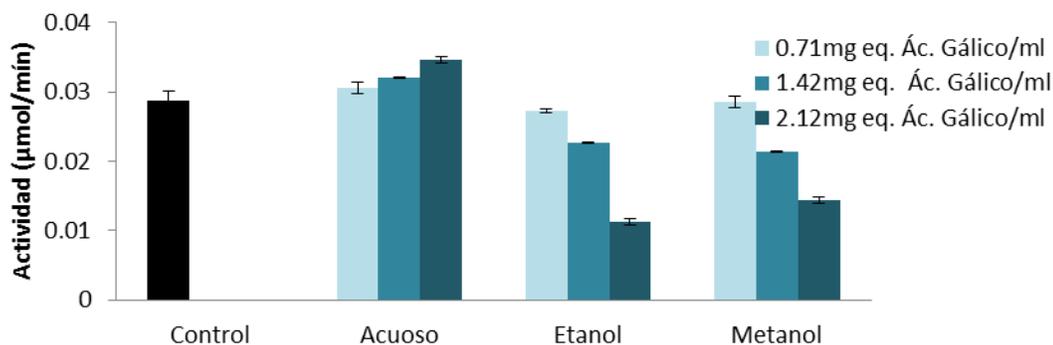


Gráfica 23. Actividad quelante de los hidrolizados obtenidos a 90°C a diferentes tiempos.

6.1.3. Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por extractos de Tallo de Amaranto

Al no haber efecto inhibitorio de la tirosinasa por los hidrolizados del material lignocelulósico del tallo de amaranto, se procedió a realizar extractos con solventes (Agua, Etanol, Metanol, Acetato de Etilo, Cloroformo y Hexano). Pero al usar cloroformo, hexano y acetato de etilo; la cantidad de Polifenoles libres no fue significativa, por lo que se decidió descartar esos solventes.

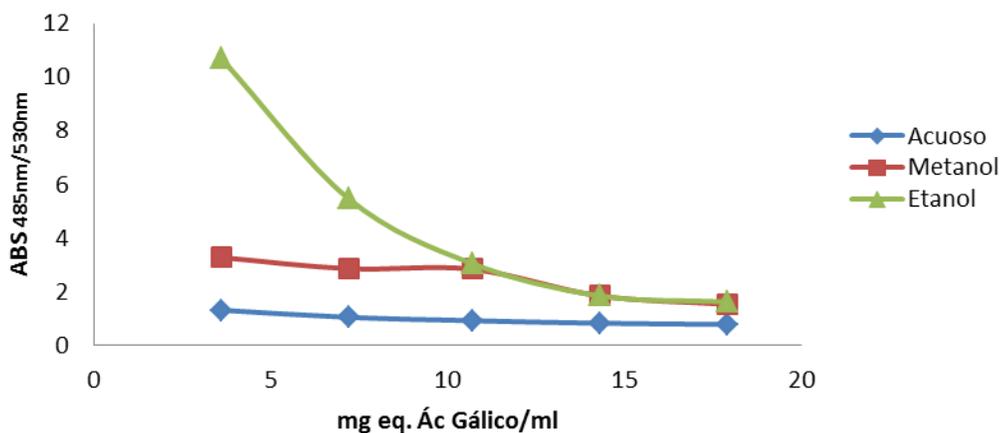
En la Gráfica 24 se observa que en el caso del extracto con agua hay efecto de activación de la enzima, y a concentración de 2.12 mgeq. trolox/ml se tiene un máximo de inhibición utilizando etanol (62±35 %). La actividad inhibitoria es dependiente de la concentración de fenoles.



Gráfica 24. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos del tallo de amaranto.

Al evaluar la capacidad quelante de Cu^{2+} se observa (Gráfica 25) que el extracto con etanol presenta buena capacidad quelante de Cu^{2+} dependiente de la concentración, como se puede

observar hay disminución en el factor quelante de Cu^{2+} (ABS 485 nm/530 nm), los extractos acuosos y con metanol presentan también quelación de Cu^{2+} pero no es dependiente de la concentración.



Gráfica 25. Actividad quelante de los extractos del tallo de amaranto.

6.2. Evaluación de extractos polifenólicos de la planta de muérdago

6.2.1. Cuantificación de polifenoles de extractos de muérdago

La Tabla 8 muestra el rendimiento de polifenoles totales de los diferentes extractos de la planta del muérdago.

Al realizar el análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias para determinar el solvente de extracción y la muestra que tiene la mayor cantidad de polifenoles expresados en mg eq. Ác. Gálico/g (determinado por regresión lineal ver apéndice D). Se concluyó que el hexano y cloroformo no fueron buenos solventes para extraer los compuestos polifenólicos del muérdago, ya que se obtuvieron las concentraciones más bajas de polifenoles. Siendo el extracto acuoso de hoja el que presentó la mayor concentración, 85.04 ± 1.68 ($p \leq 0.05$).

Tabla 8. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de muérdago.

Disolvente	Parte de la planta	Polifenoles (mg eq. Ác. Gálico/g)	
Agua	Fruto Maduro	18.57	±0.45 ^d
	Fruto Verde	29.28	±0.33 ^e
	Hoja	85.04	±1.68 ^k
	Tallo	75.45	±0.23 ⁱ
Etanol	Fruto Maduro	26.32	±0.73 ^e
	Fruto Verde	52.3	±1.39 ^g
	Hoja	15.44	±0.411 ^{c,d}
	Tallo	16.34	±0.46 ^{c,d}
Metanol	Fruto Maduro	36.65	±0.73 ^h
	Fruto Verde	33.48	±0.25 ^j
	Hoja	71.34	±1.13 ^f
	Tallo	80.13	±0.2 ^f
Ac. Etilo	Fruto Maduro	13.2	±0.99 ^{b,c}
	Fruto Verde	19.24	±5.5 ^d
	Hoja	1.72	±0.07 ^a
	Tallo	2.47	±0.36 ^a
Cloroformo	Fruto Maduro	2.01	±0.12 ^a
	Fruto Verde	0.14	±0.03 ^a
	Hoja	10.21	±0.33 ^b
	Tallo	0.28	±0.08 ^a
Hexano	Fruto Maduro	1.88	±0.1 ^a
	Fruto Verde	0.19	±0.01 ^a
	Hoja	0.11	±0.01 ^a
	Tallo	1.25	±0.09 ^a

Como se muestra en los resultados, los solventes que lograron extraer la mayor cantidad de polifenoles de la planta de muérdago fueron agua, etanol y metanol. En las extracciones en donde se utilizó etanol y metanol el tallo fue la parte de la planta de donde se logró extraer la mayor cantidad de polifenoles. Los resultados obtenidos del extracto con agua (Tallo: 75.45±0.23, Hoja: 85.04±0.23) son consistentes con los reportados (Serrano, 2011) (Tallo: 74.53±0.23, Hoja: 93.33±0.94), ya que en ambos casos la hoja es la que contiene el mayor contenido de polifenoles.

En el caso del fruto la mayor cantidad de polifenoles se encontró en los frutos verdes utilizando como solventes agua y etanol.

Los polifenoles representan un grupo diverso de compuestos que contienen múltiples funcionalidades y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los polifenoles también son los grupos más grandes de inhibidores de la tirosinasa hasta ahora. Por ello varios polifenoles son aceptados como sustratos por la tirosinasa, lo cual depende de la presencia y posición de sustituyente adicional si un polifenol puede actuar como un inhibidor (Chang, 2009). Por ello en este estudio es de suma importancia la cuantificación de polifenoles totales de cada uno de los extractos de la planta de muérdago.

6.2.2. Evaluación de la Actividad Antioxidante

En un trabajo realizado por Zhang et al., (2007) se evaluaron los efectos inhibidores de nobiletina y hesperidina de extractos crudos de cáscaras de cítricos, mostrando que el extracto etanólico de frutos cítricos puede inhibir *in vitro* la melanogénesis en células con melanoma, atribuyendo la actividad inhibitoria a la actividad antioxidante de neohesperidina de los frutos cítricos. A continuación se muestran los resultados obtenidos de actividad antioxidante de los extractos de muérdago.

6.2.2.1. Decoloración del radical catiónico ABTS

El porcentaje de reducción del radical ABTS comparado entre cada extracto, se detalla en la Tabla 9; además se representa la concentración de antioxidante expresada en concentración de Trolox (determinada por regresión lineal ver apéndice E).

Tabla 9. Porcentajes de Inhibición del radical ABTS y en equivalentes de Trolox de cada extracto de muérdago.

Disolvente	Parte de la planta	%Reducción del Radical ABTS•	Trolox (mg/ml)
Agua	Fruto Verde	97.60 ±1.08 ^{ij}	11.66 ±0.14
	Fruto Maduro	98.29 ±0.31 ^{ij}	10.32 ±0.037
	Hoja	96.69 ±0.46 ⁱ	11.54 ±0.062
	Tallo	97.29 ±0.84 ^{i,j}	11.90 ±0.11
Etanol	Fruto Verde	96.80 ±0.89 ⁱ	17.48 ±0.18
	Fruto Maduro	85.32 ±0.35 ^b	14.18 ±0.06
	Hoja	25.89 ±0.63 ^f	3.57 ±0.14
	Tallo	99.00 ±0.32 ^j	19.94 ±0.07
Metanol	Fruto Verde	99.00 ±0.56 ^j	19.08 ±0.12
	Fruto Maduro	98.66 ±0.26 ^{ij}	17.56 ±0.05
	Hoja	97.97 ±0.28 ^{ij}	9.71 ±0.03
	Tallo	98.99 ±0.54 ^j	9.53 ±0.06
Acetato de Etilo	Fruto Verde	98.98 ±0.23 ^j	4.33 ±0.01
	Fruto Maduro	97.99 ±0.49 ^{ij}	4.28 ±0.02
	Hoja	12.80 ±0.90 ^{b,c}	0.06 ±0.02
	Tallo	49.11 ±0.63 ^g	0.97 ±0.01
Cloroformo	Fruto Verde	20.31 ±0.43 ^d	0.65 ±0.02
	Fruto Maduro	12.42 ±0.47 ^b	0.14 ±0.03
	Hoja	14.77 ±0.54 ^c	0.22 ±0.02
	Tallo	22.28 ±0.43 ^{d,e}	0.27 ±0.01
Hexano	Fruto Verde	4.41 ±1.74 ^a	0.02 ±0.08
	Fruto Maduro	4.43 ±0.33 ^a	0.02 ±0.01
	Hoja	14.23 ±0.64 ^{b,c}	0.26 ±0.04
	Tallo	23.84 ±0.23 ^{e,f}	0.88 ±0.01

Los extractos que lograron tener mejor capacidad antioxidante debido a la reducción del radical ABTS, fueron aquellos en los que se utilizaron las siguientes condiciones Agua –

Frutos verdes, maduros y tallo, Etanol – Tallo, Metanol – Frutos verdes, maduros, hoja y tallo y acetato de etilo – Frutos verdes y maduros; sin diferencias significativas entre ellas con % de reducción entre 97.29 ± 0.84 y 99.00 ± 0.32 .

6.2.2.2. Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•)

El porcentaje de reducción del radical DPPH• comparado entre cada extracto, se detalla en la Tabla 10; además se representa la concentración de antioxidante expresada en concentración de Trolox (ver apéndice F) y Acido Gálico (ver apéndice G).

Tabla 10. Porcentajes de Inhibición del radical ABTS y en equivalentes de Trolox de cada extracto de muérdago.

Extracción	Muestra	%Reducción del Radical DPPH•	Trolox (mg/ml)	Ácido Gálico (mg/ml)
Agua	Fruto Verde	82.63 ± 1.57^{ij}	0.99 ± 0.0186	3.02 ± 0.08
	Fruto Maduro	$74.06 \pm 3.46^{g,h}$	0.79 ± 0.0359	2.25 ± 0.16
	Hoja	75.52 ± 2.47^h	0.91 ± 0.0292	2.64 ± 0.13
	Tallo	80.15 ± 0.52^i	0.99 ± 0.0063	2.96 ± 0.03
Etanol	Fruto Verde	93.85 ± 0.54^l	0.26 ± 0.0015	0.84 ± 0.01
	Fruto Maduro	$85.05 \pm 0.43^{j,k}$	0.37 ± 0.0018	1.13 ± 0.01
	Hoja	83.87 ± 0.43^j	0.35 ± 0.0017	1.05 ± 0.01
	Tallo	71.74 ± 1.06^g	0.32 ± 0.0046	0.89 ± 0.02
Metanol	Fruto Verde	98.62 ± 0.45^m	1.91 ± 0.0086	6.24 ± 0.04
	Fruto Maduro	97.35 ± 0.29^m	1.74 ± 0.0052	5.67 ± 0.02
	Hoja	87.91 ± 0.59^k	0.88 ± 0.0058	2.74 ± 0.03
	Tallo	91.45 ± 1.18^l	0.89 ± 0.0112	2.81 ± 0.05
Acetato de Etilo	Fruto Verde	$84.72 \pm 0.68^{j,k}$	0.25 ± 0.0020	0.76 ± 0.01
	Fruto Maduro	93.74 ± 0.17^l	0.41 ± 0.0007	1.30 ± 0.00
	Hoja	72.14 ± 0.68^g	0.32 ± 0.0030	0.90 ± 0.01
	Tallo	79.70 ± 0.45	0.35 ± 0.0019	1.05 ± 0.01
Cloroformo	Fruto Verde	29.01 ± 0.61^c	0.18 ± 0.0035	0.07 ± 0.02
	Fruto Maduro	$6.10 \pm 0.34^{a,b}$	0.05 ± 0.0020	0.52 ± 0.01
	Hoja	6.59 ± 0.17^b	0.04 ± 0.0007	0.38 ± 0.00
	Tallo	41.00 ± 0.78^f	0.09 ± 0.0016	0.14 ± 0.01
Hexano	Fruto Verde	2.95 ± 0.29^a	0.02 ± 0.0013	0.45 ± 0.01
	Fruto Maduro	$5.41 \pm 0.45^{a,b}$	0.03 ± 0.0020	0.41 ± 0.01
	Hoja	13.08 ± 0.17^c	0.09 ± 0.0010	0.34 ± 0.00
	Tallo	24.88 ± 0.34^d	0.15 ± 0.0020	0.03 ± 0.01

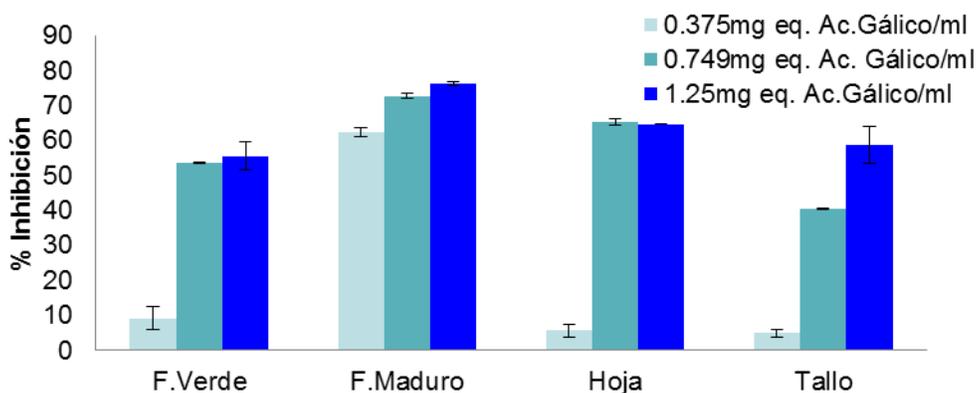
El solvente y la muestra que tiene la mayor capacidad de reducción del radical DPPH• fueron Metanol - fruto verde y fruto maduro, sin diferencias significativas entre ellas con % de reducción de 98.62 ± 0.45 y 97.35 ± 0.20 , respectivamente. Estos porcentajes de inhibición corresponden a las concentraciones en equivalentes de Trolox de 1.91 ± 0.0086 mg eq. de Trolox/ml para el extracto metanólico de fruto verde, 1.74 ± 0.0052 mg eq. de Trolox/ml para fruto maduro. Los resultados obtenidos coinciden con lo obtenido por el método de decoloración del radical ABTS•. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Kunyanga, 2011, específicamente en extractos de etanol de hojas de amaranto y hojas de palillo, con % Reducción de 92.00 ± 0.00 y 93.00 ± 0.00 respectivamente. Incluso se tienen valores superiores a los observados por un antioxidante sintético BHT (97 %), lo cual confirma que estos extractos son buenos antioxidantes.

Después de la evaluación de la actividad antioxidante por 2 métodos distintos de oxidoreducción, se observa que los extractos con metanol y agua tienen la mayor actividad antioxidante.

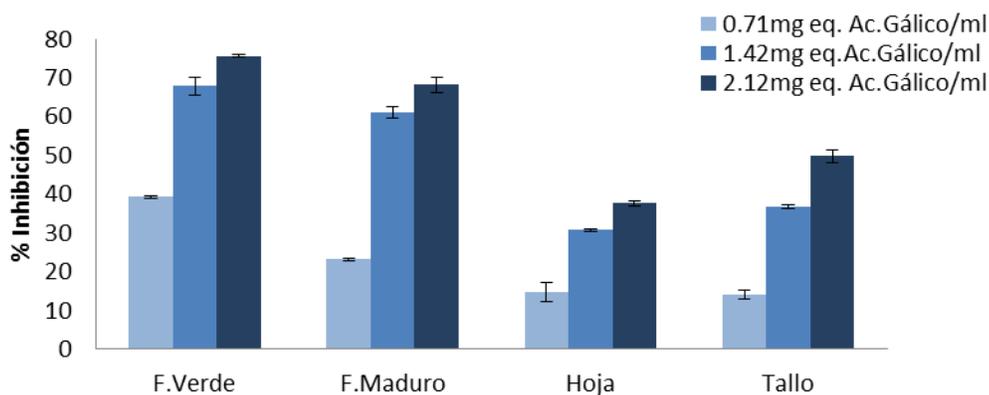
6.2.3. Evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa por extractos de Muérdago

El curso de la cinética de oxidación de la L-tirosina se observó con la formación del dopacromo con la presencia de diferentes concentraciones de extractos de muérdago.

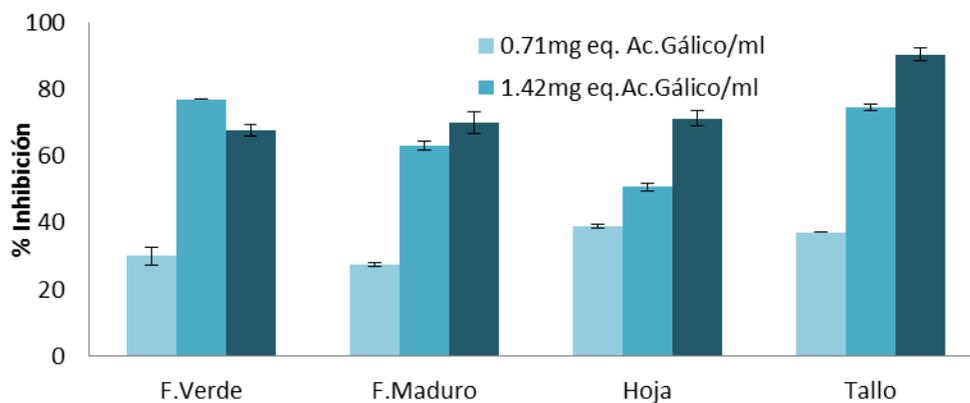
La actividad inhibitoria de la tirosinasa que presentan los extractos de las diferentes partes de la planta del muérdago se determina por un aumento en el % Inhibición, que es dependiente de la concentración de Polifenoles. Excepto para los extractos Agua – Fruto verde y Hoja, Acetato de etilo – Fruto verde, hexano – Fruto verde y Hoja, como se puede ver en las gráficas 26, 29 y 31.



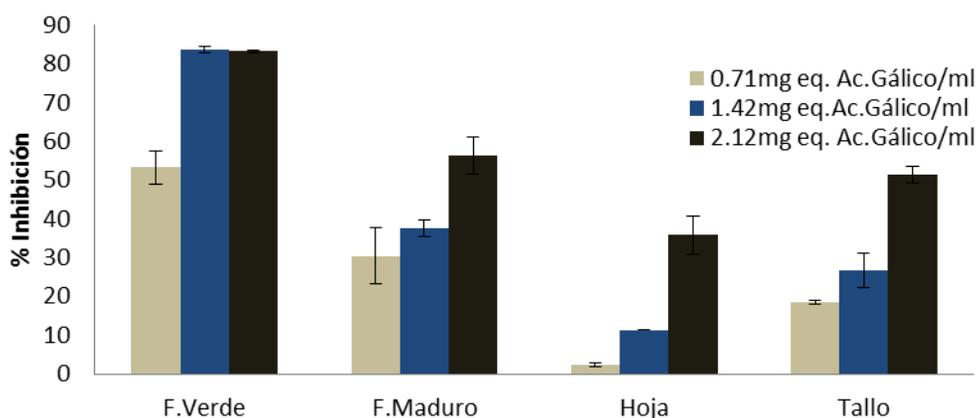
Gráfica 26. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos Agua – Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.



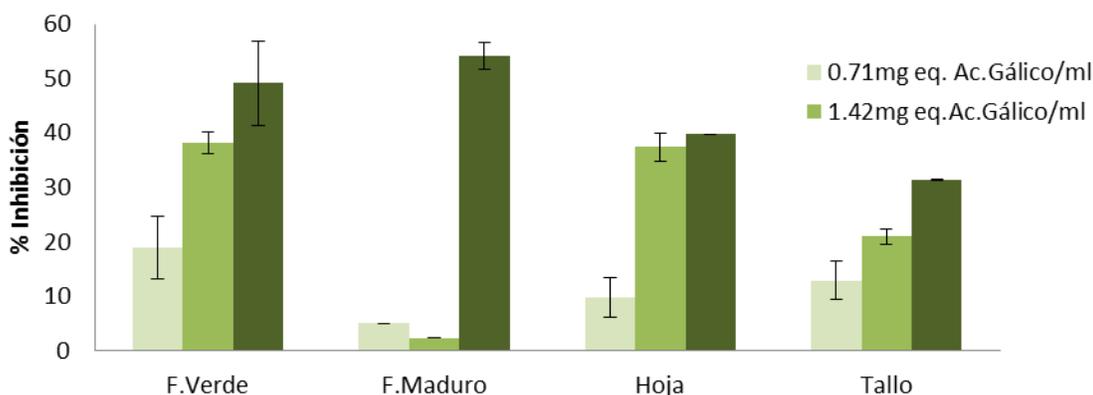
Gráfica 27. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de etanol de Fruto Maduro, Fruto. Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.



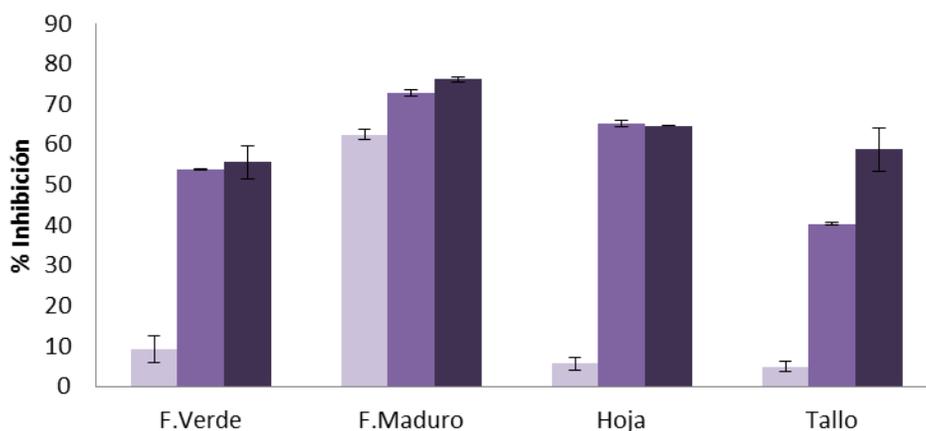
Gráfica 28. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de metanol de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.



Gráfica 29. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de acetato de etilo de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.



Gráfica 30. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de cloroformo de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.



Gráfica 31. Actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos de hexano de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.

La menor concentración 0.71 mg eq. Trolox/ml de los extractos de Agua - Fruto maduro y de Acetato de etilo - Fruto verde tienen los %Inhibición más altos 53.27 ± 1.9 y 62.40 ± 5.9 respectivamente.

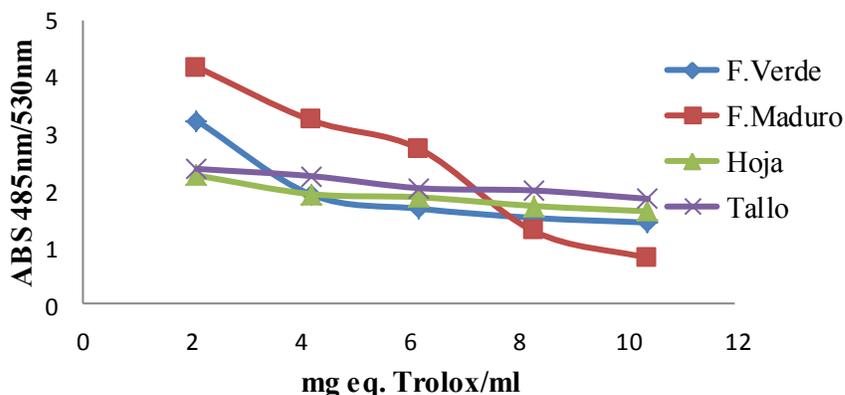
Al duplicar la concentración del extracto (1.42 mg eq. Trolox/ml), se encontró que los extractos que presentan la mayor actividad inhibitoria de tirosinasa son: Agua - Fruto maduro, Metanol - Tallo, Metanol - Fruto verde y Acetato de etilo - Fruto verde con Inhibición (%) de 72.74 ± 0.64 , 74.75 ± 0.98 , 76.92 ± 0.00 y 83.64 ± 0.93 respectivamente.

Finalmente al triplicar la concentración de extracto (2.12 mg eq. Trolox/ml) se encontró que los extractos que presentan la mayor actividad inhibitoria de tirosinasa son: Etanol-Fruto verde ($75.26\pm 0.25\%$), Agua - Fruto maduro ($76.14\pm 0.57\%$), Acetato de Etilo - Fruto verde ($83.17\pm 0.46\%$), Hexano - Fruto maduro ($85.24\pm 1.9\%$) y Metanol - Tallo (90.49 ± 1.96). Estos resultados comparables con los de la referencia ácido kójico (95%), en 10 mg / ml (Wu *et al.*, 2010).

6.2.4. Evaluación de la actividad quelante sobre el ion Cu^{2+} de los extractos de muérdago

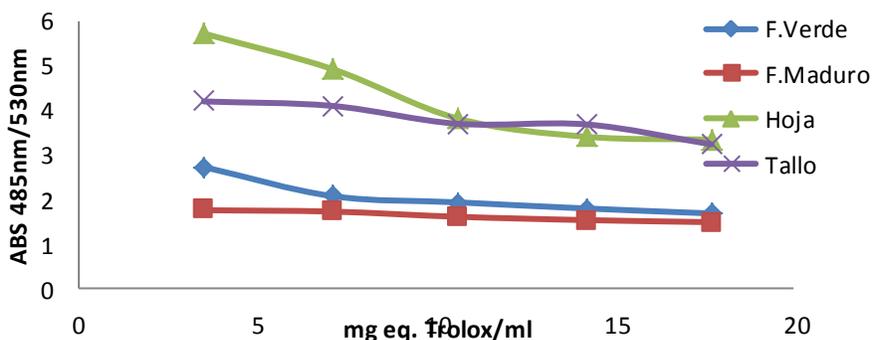
El efecto quelante que presentaron los extractos de las diferentes partes de la planta del muérdago se determina por el comportamiento descendente en la gráfica del factor de la absorbancia 485 nm/530 nm con respecto a la concentración de Polifenoles. En las gráficas 32, 33, 34, 35, 36 y 37 se muestran los resultados obtenidos.

En los extractos acuosos (Gráfica 32), se observa que la capacidad quelante de Fruto verde, hoja y tallo de muérdago es débil, y no presentan diferencias significativas entre ellos, sin embargo el extracto Agua - Fruto maduro muestra buena capacidad de quelar el ion Cu^{2+} . Estos resultados son consistentes con la actividad inhibitoria de tirosinasa, ya que para el extracto Agua - Fruto maduro se obtuvo la mayor inhibición de la enzima (76.14 %).



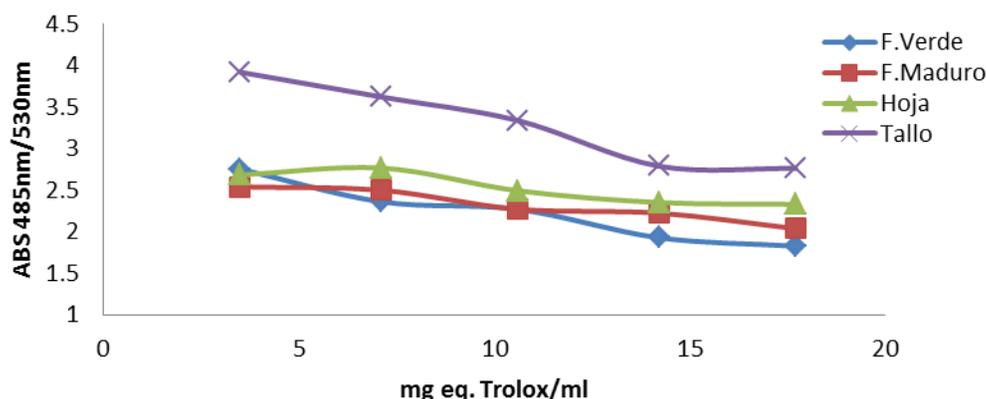
Gráfica 32. Actividad quelante de extractos acuosos de Fruto Maduro, Fruto Verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.

Los extractos de etanol (Gráfica 33), se observa la formación de dos grupos uno de ellos es el caso de los extractos de tallo y hoja que presentan débil capacidad quelante. Mientras que en el segundo grupo los extractos de frutos maduro y verde fueron que presentaron mejor capacidad quelante.



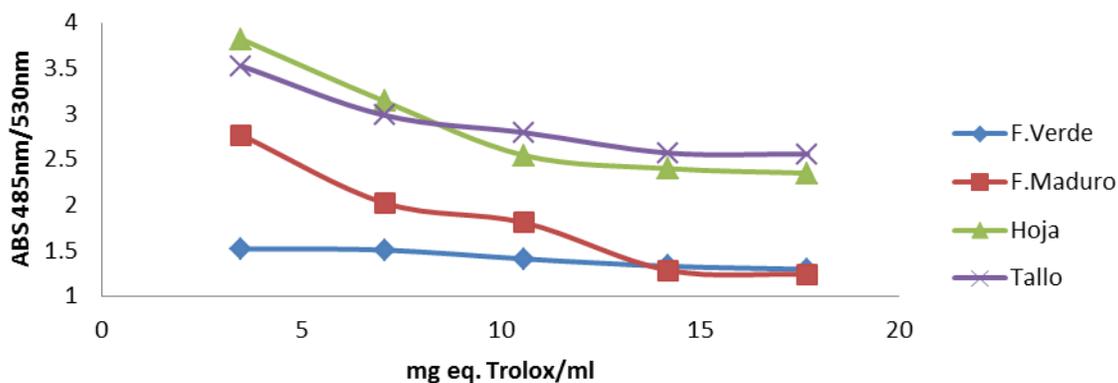
Gráfica 33. Actividad quelante de extractos de etanol de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.

En los extractos de metanol (Gráfica 34), se observa mayor capacidad quelante con los frutos y hoja, siendo el tallo el que presenta débil capacidad quelante, sin embargo el extracto de tallo presenta la mejor actividad inhibitoria.



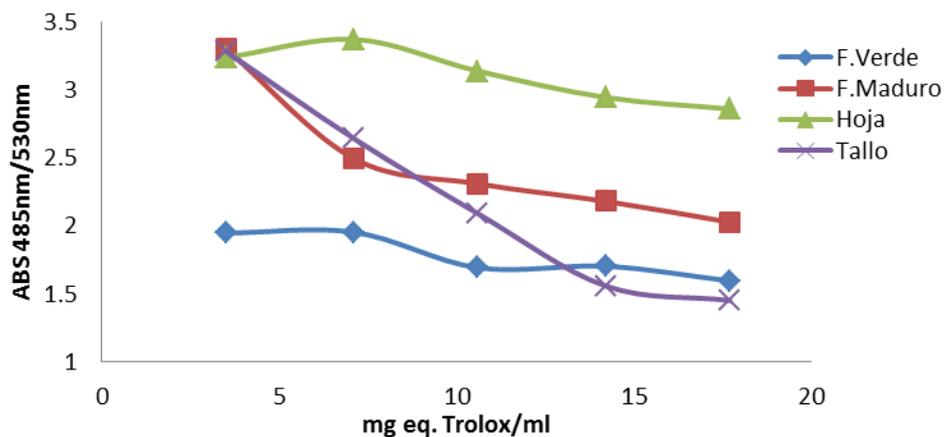
Gráfica 34. Actividad quelante de extractos de extractos de metanol de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.

Los extractos de cloroformo (Gráfica 35) presentan dos grupos, siendo los de mayor capacidad quelante el extracto con Fruto maduro y Fruto verde, al evaluar la actividad inhibitoria de tirosinasa se observa el mismo comportamiento ya que las mayores inhibiciones se obtuvieron con los frutos maduro (54.11 %) y verde (49.12 %).



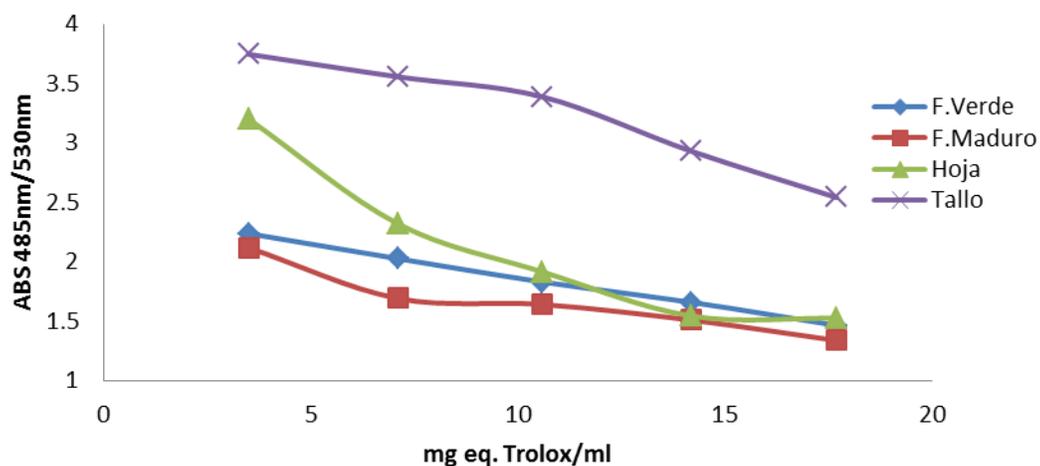
Gráfica 35. Actividad quelante de extractos de extractos de cloroformo de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.

Los extractos de acetato de etilo (Gráfica 36) muestran tener capacidad quelante de Cu^{2+} , teniendo el siguiente orden Tallo>Fruto verde>Fruto Maduro>Hoja, presentando este mismo comportamiento al evaluar la actividad inhibitoria, siendo los extractos con Fruto verde (83.17 %) y Tallo (56.30 %) los mejores inhibidores.



Gráfica 36. Actividad quelante de extractos de acetato de etilo de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.

En los extractos de hexano (Gráfica 37), se observó que el Fruto maduro, hoja y tallo tienen capacidad quelante, por el contrario en el extracto de tallo se observa que la capacidad es débil y se necesitarían concentraciones muy altas para lograr mejor capacidad quelante de Cu^{2+} . La actividad inhibitoria de tirosinasa mostró el extracto de Fruto maduro logro la mejor inhibición (76.14 %), por lo que posiblemente la inhibición se deba a la capacidad quelante de Cu^{2+} .



Gráfica 37. Actividad quelante de extractos de hexano de Fruto maduro, Fruto verde, hoja y tallo de muérdago, a diferentes concentraciones.

6.2.5. Evaluación de IC₅₀

La evaluación del valor del IC₅₀ para las muestras que presentaron la mayor actividad inhibitoria de tirosinasa (ver apéndice H), que corresponde a la concentración de extracto, a la cual se obtuvo el 50% de inhibición de la Tirosinasa, se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Valores IC₅₀ de inhibición de Tirosinasa de extractos de muérdago.

Extracción	Muestra	IC ₅₀ (mg/ml)
Agua	Fruto Maduro	1.1
Etanol	Fruto Verde	2.9
Metanol	Fruto Verde	2.1
Metanol	Tallo	4.1
Ac. Etilo	Fruto Verde	2.6
Hexano	Fruto Maduro	7.9
Hidroquinona	Control	0.048

Como se observa el extracto con menor valor de IC₅₀ fue Agua – Fruto maduro, por lo que se procedió a realizar el análisis cinético con este extracto.

Sin embargo, para los inhibidores de la tirosinasa en la literatura, los valores de IC₅₀ son incomparables debido a las condiciones variadas del ensayo, incluyendo diferentes concentraciones de sustrato, variaciones en el tiempo de incubación, y diferentes lotes de la tirosinasa comercial. Afortunadamente, en la mayoría de los estudios llevados a cabo para descubrir nuevos inhibidores de tirosinasa, se utilizan inhibidores de tirosinasa bien conocidos, tal como el ácido kójico, hidroquinona o ácido ascórbico se utilizan a menudo como estándar positivo al mismo tiempo.

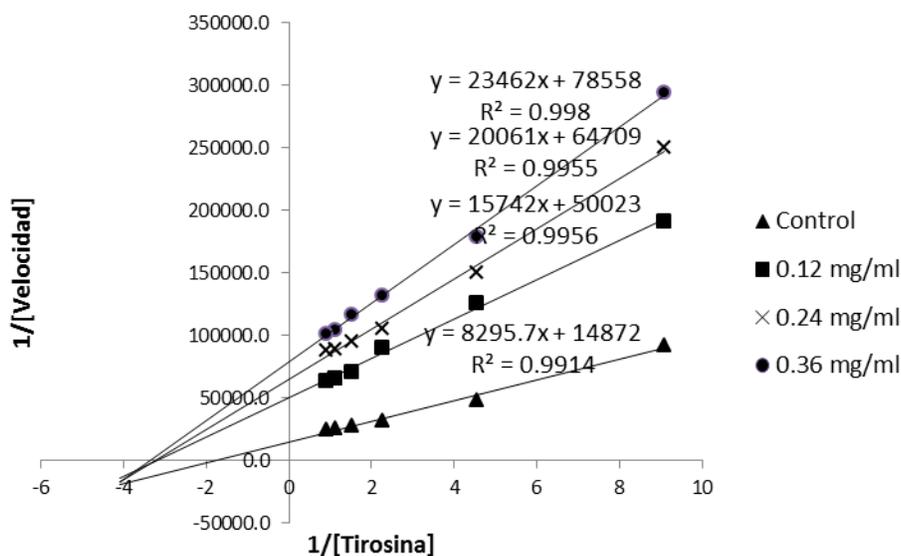
Por lo tanto, con el fin de comparar los inhibidores descritos en la literatura de una manera más práctica, se determinó la actividad inhibidora relativa (RA), que es utilizada para expresar y comparar la fuerza inhibidora de un inhibidor con otros. La cual se calcula dividiendo el valor de IC₅₀ del inhibidor control con el del inhibidor recién encontrado. En este caso se encontró que la actividad inhibitoria del extracto Agua – Fruto maduro del muérdago es aproximadamente 22 veces más grande que la HQ, el resultado obtenido se encuentra dentro de los rangos con otros inhibidores, por ejemplo: El valor de IC₅₀ del extracto de *Limonia*

acidissima con diclorometano (IC_{50} 0.546 mg/ml) fue aproximadamente 60 veces más grande que el valor del ácido kójico (0.009 mg/ml) (Wangthong *et al.*, 2010). Extractos metanólicos de la flor de *Magnolia denudata* y *M. denudata* var. *purpurascens* fueron evaluados encontrándose valores de IC_{50} de 3.34 y 10.55 mg/ml respectivamente, los cuales estuvieron entre 14 y 46 veces por encima del ácido ascórbico como control positivo (IC_{50} 0.23 mg/ml) (Jo *et al.*, 2011).

6.2.6. Parámetros cinéticos de la tirosinasa en presencia del extracto acuoso de muérdago

Para obtener más información sobre el tipo de la inhibición ejercida por el extracto de muérdago en agua que fue el que tuvo el menor valor de IC_{50} , se analizó el comportamiento cinético durante la oxidación de L-tirosina por el método de doble recíproco de Lineweaver-Burk. Las gráficas de actividad de la tirosinasa en presencia de concentraciones crecientes de L-tirosina muestran una familia de líneas rectas con pendientes diferentes que se cruzan entre sí en el segundo cuadrante (Gráfica 38).

Al aumentar la concentración del extracto acuoso de muérdago, esta no modificó la K_m de la tirosinasa, por otro lado el valor de $V_{máx}$ decreció, esto se observa en la familia de líneas con diferentes pendientes con un intercepto común en el eje X (Gráfica 38). Esta gráfica indica que el extracto acuoso de muérdago es un inhibidor no competitivo. Los parámetros cinéticos de la enzima determinados por diagramas de Lineweaver-Burk, se resumen en la Tabla 12.



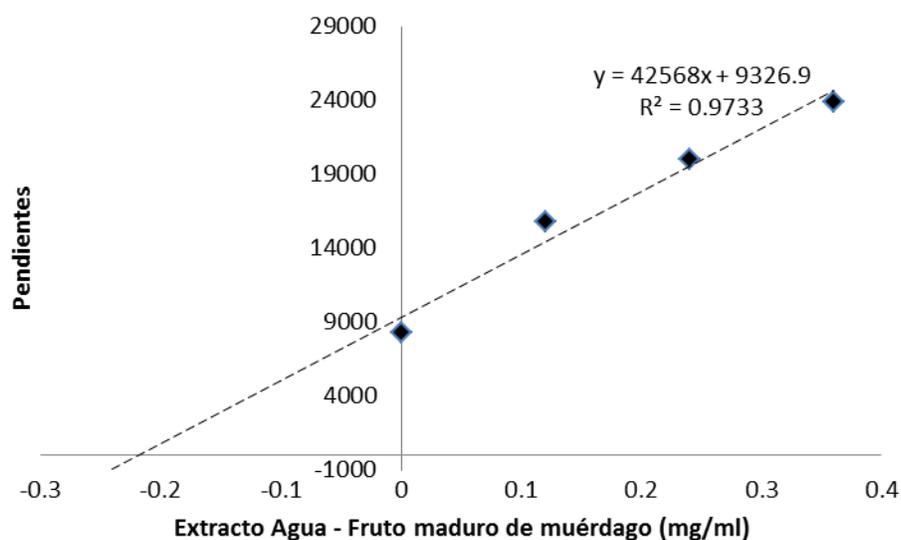
Gráfica 38. Gráfica Lineweaver-Burk de la inhibición de Tirosinasa en presencia de extracto acuoso de muérdago.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de tirosinasa con diferentes concentraciones de extracto acuoso de muérdago.

Parámetros Cinéticos			
Extracto	K_M	$V_{m\acute{a}x.}$	K_i'
Acuoso - Fruto Maduro	(mmol/ml)	($\mu\text{mol ml}^{-1}\text{m}\acute{i}\text{n}^{-1}$)	(mg/ml)
0.37mg/ml	0.31	0.0200	
0.75mg/ml	0.31	0.0155	0.22
1.12mg/ml	0.29	0.0127	

* K_i' : Constante de disociación para la unión del extracto al complejo Tirosina-L-tirosinasa.

La obtención de K_i' se obtuvo por el método gráfico (Gráfica 39), en donde la K_i obtenida fue de 0.22 mg/ml. Comparando con lo obtenido por Husni *et al.*, (2011) para extractos de etanol con *Stichopus japonicus* (K_i' : 1.33 mg/ml), se obtuvo un valor significativamente menor, lo cual indica que el extracto de Agua – Fruto maduro de muérdago tiene mayor inhibición sobre la actividad de la tirosinasa cuando está unida con la L-tirosina.



Gráfica 39. Gráfica de las pendientes Vs concentraciones de extracto acuoso de fruto maduro, para determinar la constante de inhibición K_i .

Este tipo de inhibición implica la unión de un inhibidor a sitios diferentes del sitio activo, la enzima reduce su actividad pero no afecta la unión con el sustrato. Diferentes tipos de inhibidores pueden estar presentes en el extracto, por lo tanto no podría decirse que el sitio activo de la tirosinasa esté libre de cualquier compuesto inhibidor, ya que en la evaluación de la capacidad quelante de Cu^{2+} para este extracto presentó buena actividad. En este extracto podría estar presente un compuesto que tiene mayor afinidad al complejo enzima-sustrato que al sitio de catálisis.

6.3. Resumen de resultados de la evaluación de las plantas de amaranto y muérdago

6.3.1. Resultados de la planta de amaranto

En la Tabla 13 se presenta el resumen de los resultados obtenidos de actividad inhibitoria de tirosinasa y capacidad quelante de Cu^{2+} de las proteínas de amaranto, material lignocelulósico del tallo y extractos del tallo de la planta.

Muestra		Actividad Inhibitoria de Tirosinasa	Capacidad Quelante de Cu^{2+}	Observaciones
Proteínas	Albúmina	-	+	Se observó activación de la actividad enzimática
	Globulina	-	+	
	Glutelina	-	+	
Hidrolizados 3, 21, 30, 36 y 48 h	Albumina	-	+	Se observó activación de la actividad enzimática
	Globulina	-	+	
	Glutelina	-	+	
Fracciones peptídicas	Albumina	+	+	Solo se presentan las fracciones peptídicas que presentaron inhibición
	Globulina	+	+	
	Glutelina	+	+	
Hidrolizados del Material Lignocelulósico (t = 30, 60, 90, 120 y 150 min)(T = 90, 100, 110 y 120 °C)		-	+	No se encontró efecto sobre la actividad de la tirosinasa
Extractos del Tallo	Agua	-	+	El extracto con agua favoreció la actividad de la tirosinasa
	Etanol	++	+	
	Metanol	+	+	

(-): No hay inhibición o capacidad quelante

(+): Hay actividad inhibitoria o capacidad quelante baja

(++): Hay actividad inhibitoria o capacidad quelante moderada

6.3.2. Resultados de la planta de muérdago

En la Tabla 14 se presenta el resumen de los resultados obtenidos de actividad inhibitoria de tirosinasa y capacidad quelante de Cu^{2+} de extractos polifenólicos de muérdago.

Extractos	Actividad Inhibitoria de Tirosinasa	Capacidad Quelante de Cu^{2+}	Observaciones
Agua	Fruto maduro	+++	La inhibición podría estar relacionada con la capacidad quelante, ya que en ambos casos se obtuvieron mejores resultados con el fruto maduro.
	Fruto verde	++	
	Hoja	++	
	Tallo	++	
Etanol	Fruto maduro	+++	Los extractos de frutos maduro y verde presentaron inhibición de 68.2 y 75.6 % respectivamente, lo cual podría deberse con la capacidad quelante.
	Fruto verde	+++	
	Hoja	+	
	Tallo	++	
Metanol	Fruto maduro	++	El extracto de tallo presento la mejor inhibición, sin embargo en este caso la capacidad quelante de Cu^{2+} , no fue la mejor.
	Fruto verde	++	
	Hoja	++	
	Tallo	+++	
Acetato de Etilo	Fruto maduro	++	La mejor inhibición se obtuvo con fruto verde (83.2 %) y tallo (51.3 %), las cuales podrían estar ligadas a la capacidad quelante
	Fruto verde	+++	
	Hoja	+	
	Tallo	++	
Cloroformo	Fruto maduro	++	En general los extractos con cloroformo no presentaron inhibición significativa, sin embargo es en el fruto maduro donde se observa mejor inhibición (54.1 %).
	Fruto verde	+	
	Hoja	+	
	Tallo	+	
Hexano	Fruto maduro	+++	En el fruto maduro es donde se presentó mejor inhibición (76.1 %), en general los extractos presentaron buena capacidad quelante excepto el tallo
	Fruto verde	++	
	Hoja	+++	
	Tallo	++	

(-): No hay inhibición o capacidad quelante

(+): Hay actividad inhibitoria o capacidad quelante baja

(++): Hay actividad inhibitoria o capacidad quelante moderada

(+++): Hay actividad inhibitoria o capacidad quelante alta

7. Conclusiones

- En la planta *Amaranthus hypochondriacus*. Las proteínas del grano (Albúmina 1, Globulina y Glutelina), así como sus respectivos hidrolizados no mostraron actividad inhibitoria de tirosinasa importante, posiblemente por la presencia de residuos de aminoácidos como tirosina, arginina se favoreció su actividad. Los hidrolizados del material lignocelulósico del tallo no mostraron efecto sobre la actividad enzimática. Esto se relaciona con la débil capacidad quelante que no fue suficiente para lograr la inhibición; sin embargo el extracto con etanol – tallo, logro reducir la actividad pero no lo suficiente como los inhibidores sintéticos.
- En la planta *Cladocolea loniceroides*. El extracto de Agua – Fruto maduro logro la mejor inhibición debido a que se obtuvo el menor valor de IC₅₀, presentando inhibición no competitiva, por lo que para este extracto no es necesario unirse al sitio activo y por ello a pesar de presentar buena capacidad quelante de cobre, no es factor determinante sobre la actividad inhibitoria de tirosinasa.

Dicha conclusiones se sustentan en los siguientes hallazgos:

1. Los residuos de tirosina de las proteínas del amaranto como la albúmina 1, globulina y glutelina, así como la caseína y la ovoalbúmina no son utilizados como substrato por la tirosinasa.
2. Las proteínas del amaranto, la caseína y la ovoalbúmina no tienen capacidad inhibitoria de la tirosinasa, por el contrario estimulan la actividad de la tirosinasa.
3. Los hidrolizados de las proteínas del amaranto (albúmina 1, globulina y glutelina) así como hidrolizados de caseína y ovoalbúmina estimulan la actividad de la tirosinasa.
4. Los hidrolizados de las proteínas del amaranto (albúmina 1, globulina y glutelina) poseen una débil capacidad quelante del Cu²⁺ que no contribuyo para la inhibición de la actividad de la tirosinasa.

5. El fraccionamiento de los hidrolizados de las proteínas del amaranto por filtración en gel, sólo rindieron una fracción peptídica de 0.8 kDa que logra inhibir la actividad de la tirosinasa en un $25\pm 2.29\%$.
6. Las fracciones peptídicas de las proteínas del amaranto obtenidas por filtración en gel mostraron una baja capacidad quelante del Cu^{2+} , la cual no fue suficiente para inhibir la actividad de la tirosinasa. Excepto para la fracción de albúmina 0.8 kDa.
7. La actividad inhibitoria del $25\pm 2.29\%$ de la tirosinasa por la fracción peptídica 0.8 kDa de albúmina mostró que no es dependiente de la concentración en el rango de 0.027-0.16mg/ml.
8. De los 24 extractos obtenidos con diferentes solventes, 5 presentaron una fuerte inhibición de la tirosinasa, entre los cuales no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).
9. A una concentración de antioxidante de 2.12mg eq. Ác. Galico/ml, los extractos presentaron la siguiente actividad inhibitoria:
Etanol-F.Verde ($75.26\pm 0.25\%$),
Acuoso-F.Maduro ($76.14\pm 0.57\%$),
Acetato de Etilo-F.Verde ($83.17\pm 0.46\%$),
Hexano-F.Maduro ($85.24\pm 1.9\%$) y,
Metanol-Tallo (90.49 ± 1.96).
10. El %Inhibición mostro ser dependiente de la concentración de antioxidante.
11. Estos resultados fueron consistentes con los parámetros de capacidad quelante de Cu^{2+} , ya que a altas concentraciones de extractos se muestra un incremento en la quelación de ión Cu^{2+} .
12. La evaluación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa de los hidrolizados del material lignocelulósico de amaranto no mostro efecto significativo ($p < 0.05$). Sin embargo se encontró que los hidrolizados tienen capacidad quelante del Cu^{2+} , la cual no es suficiente para la inhibición de la actividad de la tirosinasa.

13. De los extractos del tallo de amaranto, el extracto de etanol presento la mayor actividad inhibitoria del $60.62 \pm 35\%$, y también mostro una alta capacidad quelante del Cu^{2+} .
14. El estudio de la cinética realizado al extracto acuoso del fruto maduro de muérdago, revelo que la inhibición de la enzima fue no competitiva, dejando libre al sitio catalítico para otros compuestos inhibidores de menor afinidad.

8. Recomendaciones

Para un mejor conocimiento de la actividad inhibitoria de la tirosinasa del extracto acuoso de fruto de muérdago maduro *Cladocoleo loniceroides*, se sugieren los siguientes estudios.

- Purificar y caracterizar el compuesto polifenólico que confiere la actividad inhibitoria de tirosinasa.
- Evaluar el efecto de los extractos en la síntesis de melanina en melanocito humano.
- Realizar la evaluación del efecto citotóxico en melanocitos humanos.

9. Bibliografía

Amer M and Maged M. 2009. Cosmeceuticals versus pharmaceuticals. *Clinics Dermatology*. 27: 428-430.

Arce Vázquez María Belém. 2011. Tesis, “Obtención de compuestos biofuncionales a partir del material lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus L.*” Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 51-55.

Bissett DL. 2009. Common cosmeceuticals. *Clinics in dermatology*. 27: 435-445

Brand-Williams W, Cuvelier E, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*. 28. 25-30.

Bressani R, González JM, Zuñiga J, Breuner M y Elías LG. 1987. Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 38: 347-353

Briganti S, Camera E, Picardo M. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res* 16:101–10

Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol* 46:982–5

Chen MJ, Liu JR, Sheu JF, Lin CW y Chuang CL. 2006. Study on skin care properties of milk Kefir Whey. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 2006. Vol 19, No. 6 : 905-908

Cosmetics y Toiletries (Latinoamérica). 2009. Nutricosméticos. Belleza de dentro para fuera. 8: 7-11.

DeCaprio AP. 1999. The toxicology of hydroquinone – relevance to occupational and environmental exposure. *Crit Rev Toxicol* 29:283–330

Dziuba J, Iwaniak A y Minkiewicz P. 2003. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. *Polymer*. 48: 50-53.

Draelos ZD. 2010. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. *Clinic in Dermatology*. 28: 400-408.

El-Hafidi M, Baños G. 1997. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension*. 30: 624-628.

Ennes SBP, Paschoalick RC, De Avelar Alchorne MM. 2000. A double-blind, comparative, placebo-controlled study of the efficacy and tolerability of 4 hydroquinone as a depigmenting agent in melasma. *J Dermatolog Treat* 11:173–9

Finlay AY. 1997. Quality of life measurement in dermatology: a practical guide. *Br J Dermatol* 136:305–14

Freshney I. 1992. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. En: *Animal cell culture. A practical approach*. 2nd edition. The Practical Approach Series. USA. 15-44.

Hermanns JF, Pierard-Franchimont C, Pie´rard GE. 2000. Skin colour assessment in safety testing of cosmetics. An overview. *Int J Cosmet Sci* 22:67–71

Ho KH, Chop S, Lee S, Han K K, Hyun KC, Chul H E y Ho CJ. 2006. Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin *in vivo*. *Journal of Lipid Research*. 47: 2006.

Huang D, Ou B and Prior R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.

Jae JY, Zhong QJ, Hee BG y Se KK. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis.

Jimbow K, Obata H, Pathak MA, Fitzpatrick TB. 1974. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J Invest Dermatol* 62:436-49

Johnston GA, Sviland L, McLelland J. 1998. Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *Br J Dermatol* 139:932

Kadekaro AL, Kanto H, Kavanagh R, Abdel-Malek ZA. 2003, Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 994:359-65

Kamal-Eldin A, Pokorný J. 2005. Ultraviolet-Visible spectrophotometry in the analysis of lipid oxidation. En: *Analysis of Lipid Oxidation*. AOCS Press. USA. 17-39.

Kojima S, Yamaguchi H, Morita K, Ueno Y. 1995. Inhibitory effect of sodium 5,6 benzyldiene ascorbate (SBA) on the elevation of melanin biosynthesis induced by ultraviolet A (UV-A) light in cultured B-16 melanoma cells. *Biol Pharm Bull* 18:1076-80

Konishi Y, Fumita Y, Ikeda K, Okuno K. y Fuwa H. 1985. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *Agriculture Biological Chemistry*. 49: 1453-1458.

Kubo, I. and I. Kinst-Hori. 1999. Flavonols from Saffron Flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agri. Food Chem.* 47:4121-4125

Lacz NL, Vafaie J, Kihiczak NI, Schwartz RA. 2004. Postinflammatory hyperpigmentation: a common but troubling condition. *Int J Dermatol* 43:362–5

Lindquist NG. 1973, Accumulation of drugs on melanin. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 325:1–92.

Lupo MP y Cole AL. 2007. Cosmeceutical peptides. *Dermatol Ther* 20:343–9

Lynde CB, Kraft JN, Lynde CW. 2006, Topical treatments for melasma and postinflammatory hyperpigmentation. *Skin Therapy Lett* 11:1–6.

Maeda K, Fukuda M.1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther* 276:765–9

Miller GL, 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31. 426-428.

Morales GJC, Vázquez MN y Bressani CR. 2009. El Amaranto. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Morales JAG, Fernández AMS, Bautista MA, Vargas NM y Madrigal EOS. 2009. Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. Vol. I y II

Ndhlala A, Anthonissen R, Stafford G, Finnie J, Verschaeve L and Van Staden J. 2010. In vitro cytotoxic and mutagenic evaluation of thirteen commercial herbal mixtures sold in KwaZulu-Natal, South Africa. *South African Journal of Botany*. 76: 132-138.

Nichols JA y Katiyar SK. 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*. 302: 71-83.

Ortega-Desgado E. 2009. Amaranto: planta latinoamericana con fuerzas colosales. *Informaciones Madeleine Porr /proyecto El Pan Alegre*. 1-12.

Osborne TB. 1924. The vegetable proteins. *Monographs in Biochemistry*. 2a. edición. Logmans, Green and Co., Nueva York.

Palumbo A, d'Ischia M, Misuraca G, Prota G. 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochim Biophys Acta* 1073:85–90

Paredes OL, Guevara F L y Bello LAP. 2006. Amaranto. En: *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. FCE, SEP, CONACYT, CAB (Colec. La ciencia para todos). México D.F. 88-104.

Park HJ, Perez R, Laursen and B Gilchrest. 1998. A tyrosinase mimetic peptide inhibits tyrosinase activity in cultured human melanocytes. *J. Dermatol. Sci.* 16:133.

Parvez S, Kang MCH, Cho C, Hong MC y Shin MK. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res.* 20:921-34.

Pathak MA, Fitzpatrick TB, Kraus EW. 1986. Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. *J Am Acad Dermatol* 15(4 Part 2):894–9

Petit L, Pierard GE. 2003, Skin-lightening products revisited. *Int J Cosmet Sci* 25:169–81

Piao XL, Baek SH, Park MK, Park JH. 2004. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica dahurica*. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1144-1146.

Rendon M, Berneburg M, Arellano I, Picardo M. 2006. Treatment of melasma. *J Am Acad Dermatol* 54: S272–81

Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, García-Ca'novas F, García-Carmona F. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1247:1–11

Schallreuter KU, Wood JW. 1990. A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Arch Dermatol Res* 282:168–71

Schurink M, Wichers HJ, Boeriu CG. 2006. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *El Sevier* 28:485-495

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: <http://www.sagarpa.gob.mx>

Segura NM, Barba de la Rosa A P y Paredes L O. 1994. *Biochemistry of amaranth protein*. In O. Paredes-López (Ed.). *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology* (pp. 75-106). Boca Ratón, Florida: CRC Press.

Serrano-Maldonado MJ, Guerrero-Legarreta I, Pérez-Overa CD y Soriano-Santos J. 2011. Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect of Cadocolea Ioniceroides. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10:161-170

Silva SC, Barba de la Rosa AP, León GMF, de Lumen BO, León RA y González M E. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 1233-1240.

Soriano JS, Iwabuchi S y Fujimoto K. 1992. Solubility of amaranth seed proteins in sodium sulphate and sodium chloride: the main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 27: 337-346.

Tabor A y Blair RM. 2009. Nutritional cosmetics: Beauty from within. William Andrew: Applied Science Publisher.

Tovar PE, Guerrero LI, Farrés GA y Soriano SJ. 2009. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*. 116: 437-444.

Ubeid AA, Zhao L, Wang Y y Hantash BM. 2009. Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *Journal of Investigative dermatology*. 1-8.

Wangthong S, Palaga T, Rengpipat S, Wanichwecharungruang SP, Chanchaisak P, Heinrich, M. 2010. Biological activities and safety of thanaka (*Hesperethusa crenulata*) stem bark. *J Ethnopharmacol* 132: 466–72.

Wu SJ, Chiang YT, Tzeng WS, Shyu YT. 2010. Function properties of extracts from albedo tissues of pummel (*Citrus grandis* Osbeck). *J Biotechnol* 150S:S1–S576.

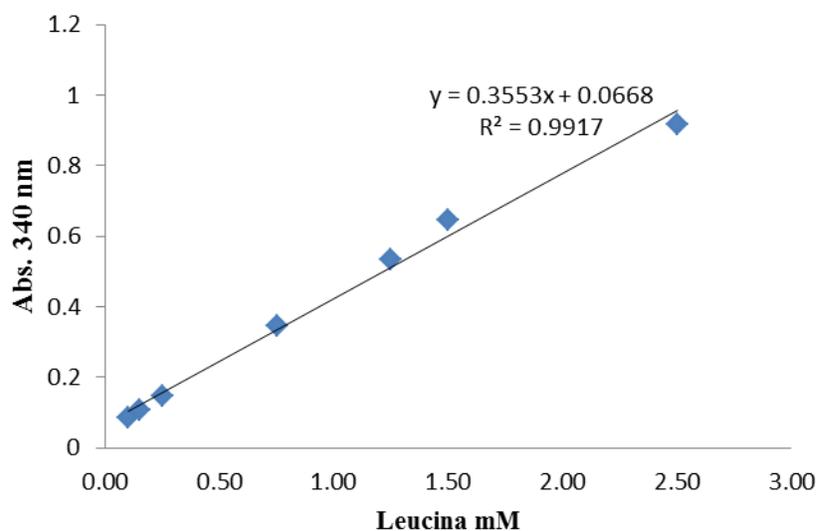
Yen GC, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 27-32.

Zhang L y Falla TJ. 2009. Cosmeceuticals and peptides. *Clinics Dermatology*. 27: 485-494.

10. Apéndices**Apéndice A**

Análisis de Regresión lineal para determinar las concentraciones de los hidrolizados de las proteínas del grano de amaranto.

Leucina (mM)	ABS (340 nm)
0.10	0.085±0.003
0.15	0.106±0.003
0.25	0.145±0.006
0.75	0.347±0.004
1.25	0.535±0.004
1.50	0.644±0.005
2.50	0.915±0.006



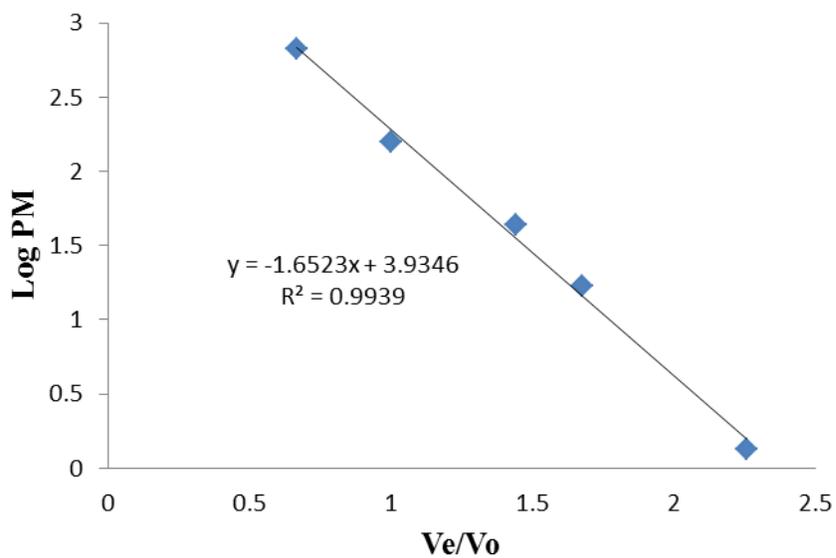
Apéndice B

Curva patrón de marcadores utilizados en filtración en gel Sephadex G-15.

Estandar	Ve/Vo	Log (PM)
Triosafosfatoisomerasa	0.607	1.425
Mioglobina	1.221	1.23
α lactoalbúmina	1.513	1.152
Aprotinina	2.133	0.813
Insulina	2.667	0.544
Bradicinina	3.487	0.025

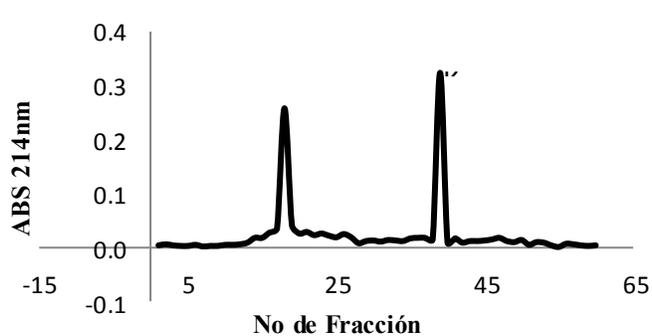
a Volumen de elusión/volumen vacío

b Peso molecular

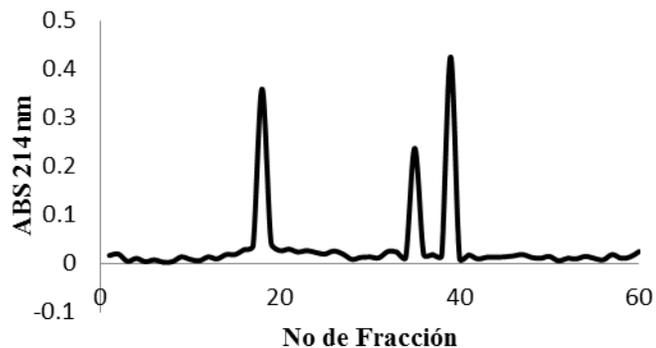


Apéndice C

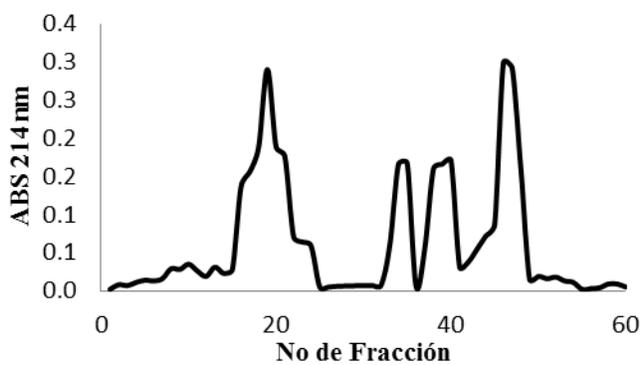
Perfiles de filtración en gel Sephadex G-15 de los hidrolizados de albúmina 1.



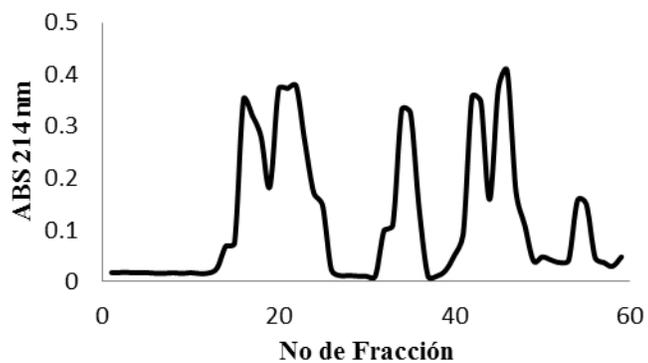
Hidrolizado de 3 h



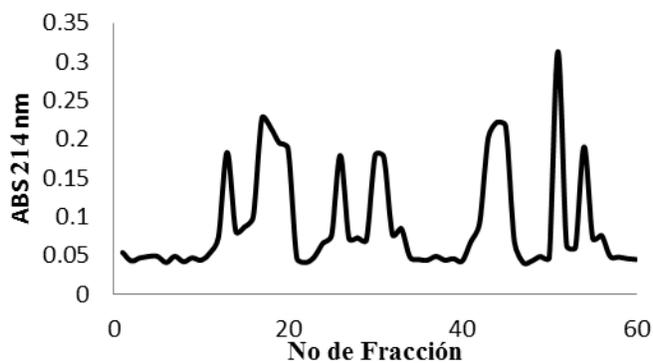
Hidrolizado de 21 h



Hidrolizado de 30 h

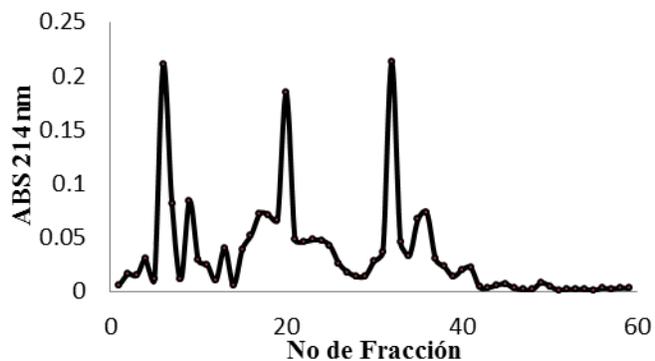


Hidrolizado de 36 h

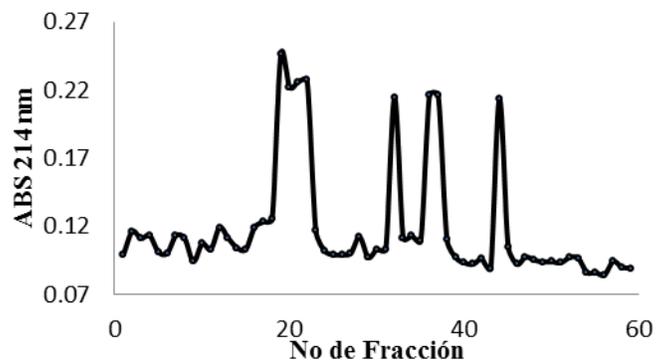


Hidrolizado de 48 h

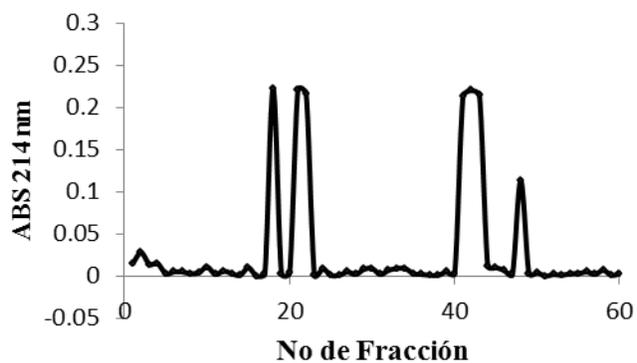
Perfiles de filtración en gel Sephadex G-15 de los hidrolizados de globulina.



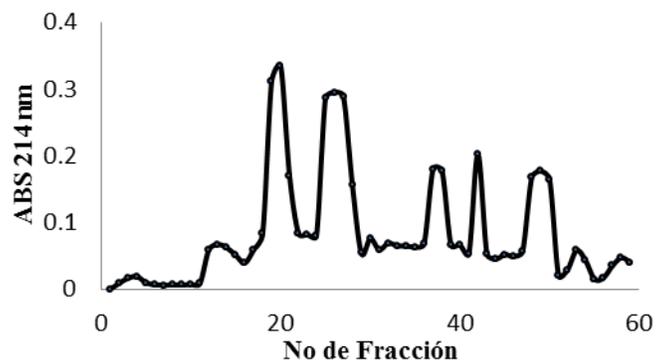
Hidrolizado de 3 h



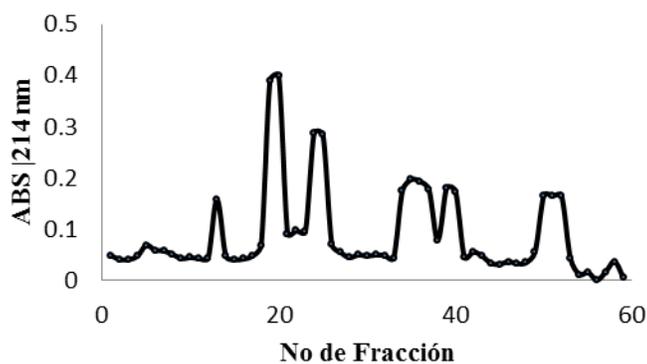
Hidrolizado de 21 h



Hidrolizado de 30 h

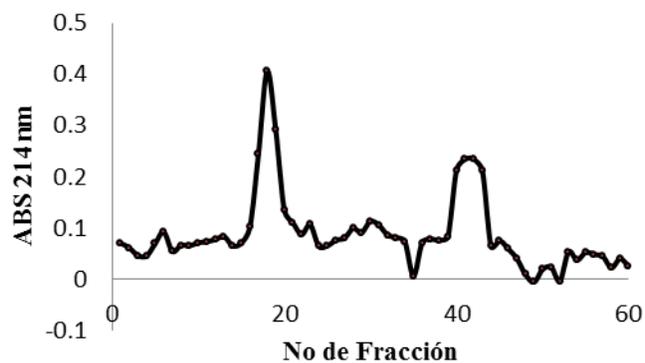


Hidrolizado de 36 h

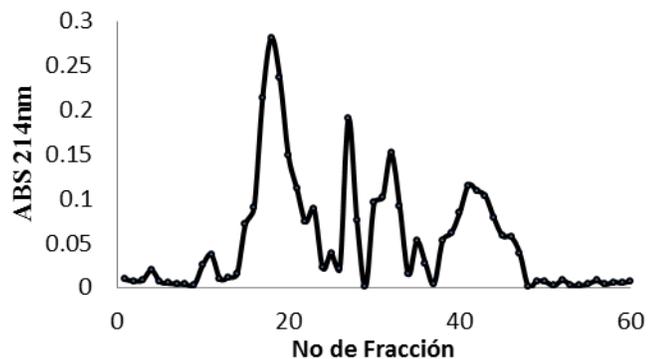


Hidrolizado de 48 h

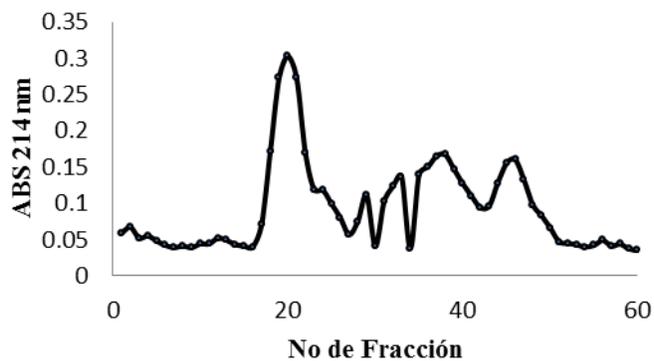
Perfiles de filtración en gel Sephadex G-15 de los hidrolizados de glutelina.



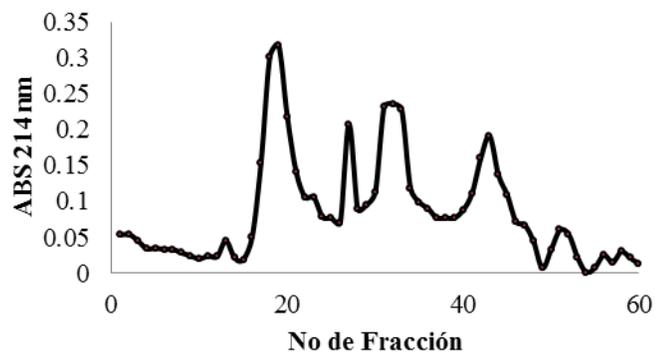
Hidrolizado de 3 h



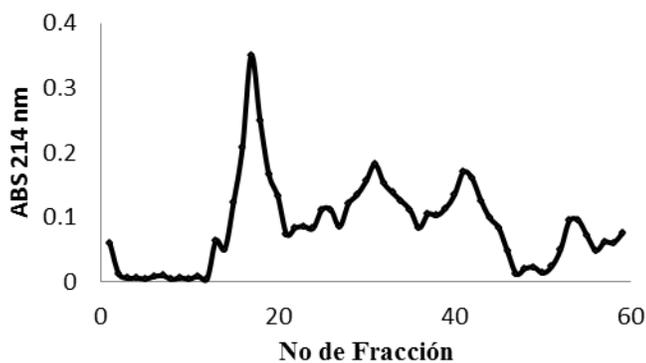
Hidrolizado de 21 h



Hidrolizado de 30 h



Hidrolizado de 36 h



Hidrolizado de 48 h

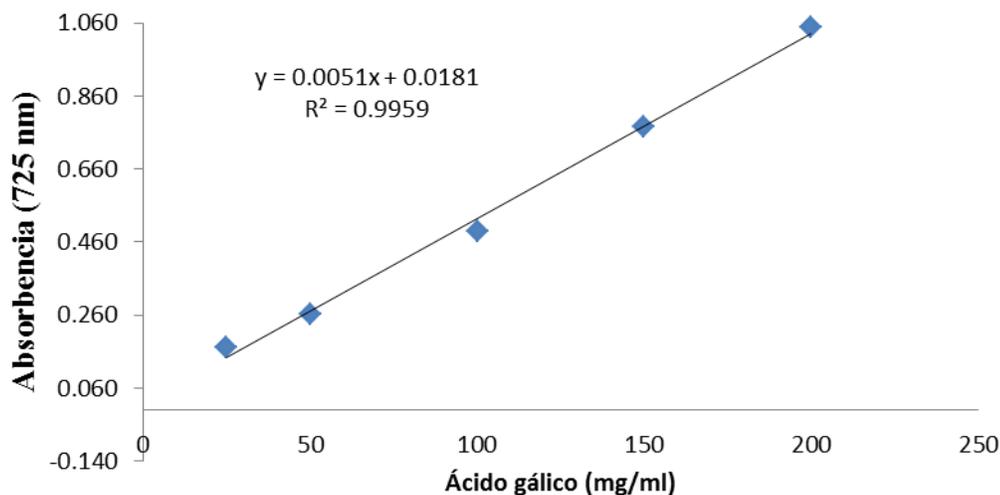
Apéndice D

Curva estándar en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

En la tabla A1 se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de polifenoles totales en los extractos de muérdago. Así mismo, en la gráfica A1, se muestra la curva de ácido gálico (mg/L) versus absorbencia a 725nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de polifenoles en equivalentes de ácido gálico.

Tabla A 1. Curva estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales

Ácido gálico (mg/ml)	Absorbencia (725 nm)
25	0.171 ±0.0372
50	0.263 ±0.0119
100	0.491 ±0.0168
150	0.777 ±0.0111
200	1.046 ±0.0246



Gráfica A 1. Curva estándar de Ácido gálico para la cuantificación de polifenoles

Apéndice E

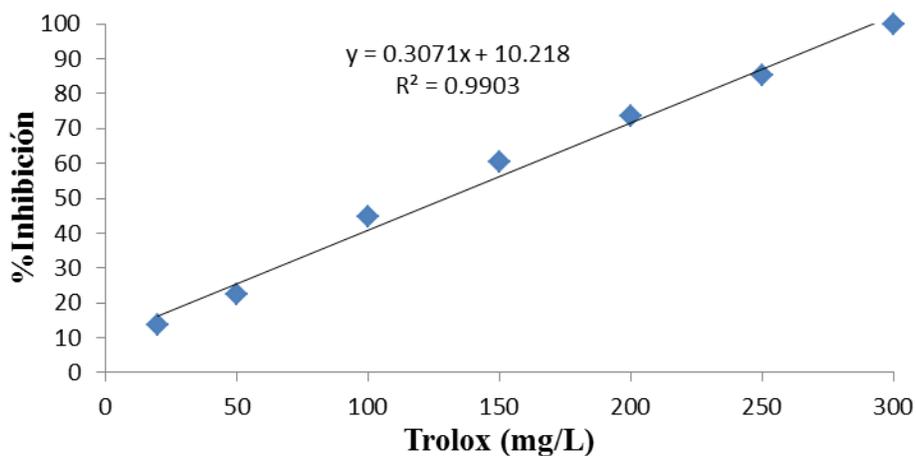
Curva estándar para la cuantificación de polifenoles expresada en equivalentes de Trolox.

En la Tabla A2 se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la cuantificación de polifenoles totales en las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica A2 se muestra la curva de Trolox (mg/L) versus % Reducción del radical ABTS (absorbencia a 725 nm) y su respectiva ecuación, para la determinación de polifenoles en equivalentes de Trolox.

Tabla A 2. Curva estándar de Trolox para cuantificación de polifenoles totales

Trolox (mg/L)	% Reducción del radical ABTS
20	13.82
50	22.5
100	44.79
150	60.3
200	73.48
250	85.34
300	99.86



Gráfica A 2. Curva estándar de Trolox para la cuantificación de polifenoles

Apéndice F

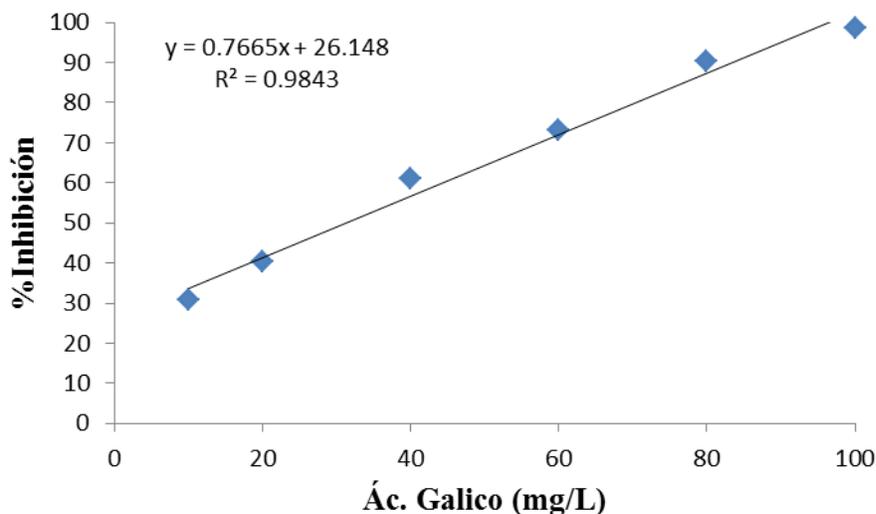
Curva estándar en equivalentes de Ácido gálico para la evaluación de la inhibición del radical DPPH•

En la Tabla A3 se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la evaluación de la reducción del radical DPPH• de las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica A3 se muestra la curva en equivalentes de ácido gálico (mg/L) versus % de inhibición del radical DPPH• a 517 nm y su respectiva ecuación obtenida de su correspondiente linealización, para la evaluación de la capacidad antioxidante en mg equivalentes de ácido gálico.

Tabla A 3. Curva estándar de ácido gálico para la evaluación de equivalentes de reducción de DPPH•

Ác. Galico mg/L	%Inhibición
10	30.76
20	40.37
40	61.15
60	73.23
80	90.41
100	98.57



Gráfica A 3. Curva estándar de ácido gálico para la evaluación de reducción de radical DPPH•

Apéndice G

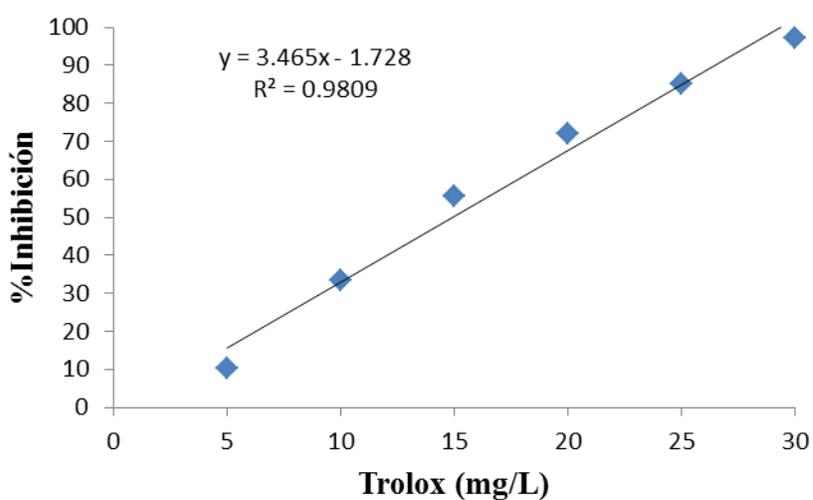
Curva estándar en equivalentes de Trolox para la evaluación de la inhibición del radical DPPH•

En la Tabla A4 se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la evaluación de la reducción del radical DPPH• de las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica A4 se muestra la curva en equivalentes de Trolox (mg/L) versus % de inhibición del radical DPPH• a 517 nm y su respectiva ecuación, para la evaluación de la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox.

Tabla A 4. Curva estándar de Trolox para la evaluación de equivalentes de reducción de DPPH•

Trolox mg/L	%Inhibición
5	10.26
10	33.33
15	55.55
20	71.97
25	85.25
30	97.1

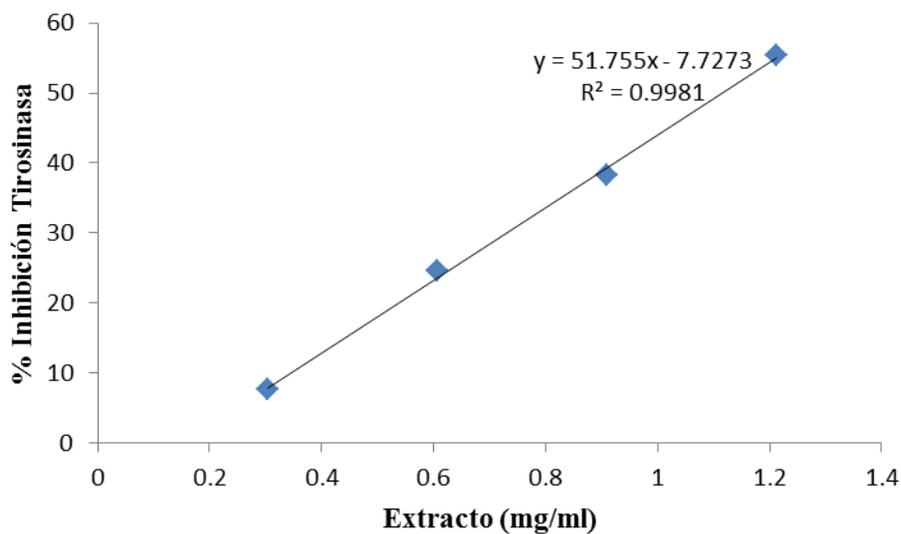


Gráfica A 4. Curva estándar de Trolox para la evaluación de reducción de radical DPPH•

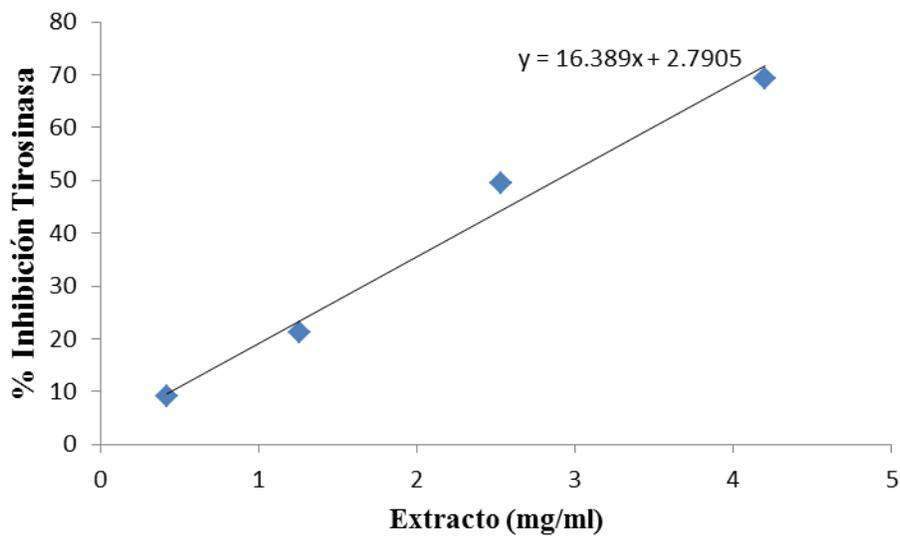
Apéndice H

Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ de los extractos de muérdago:Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ del extracto Agua – Fruto Maduro

Extracto (mg/ml)	% Inhibición de Tirosinasa
0.303	7.7
0.606	24.5
0.909	38.2
1.212	55.5

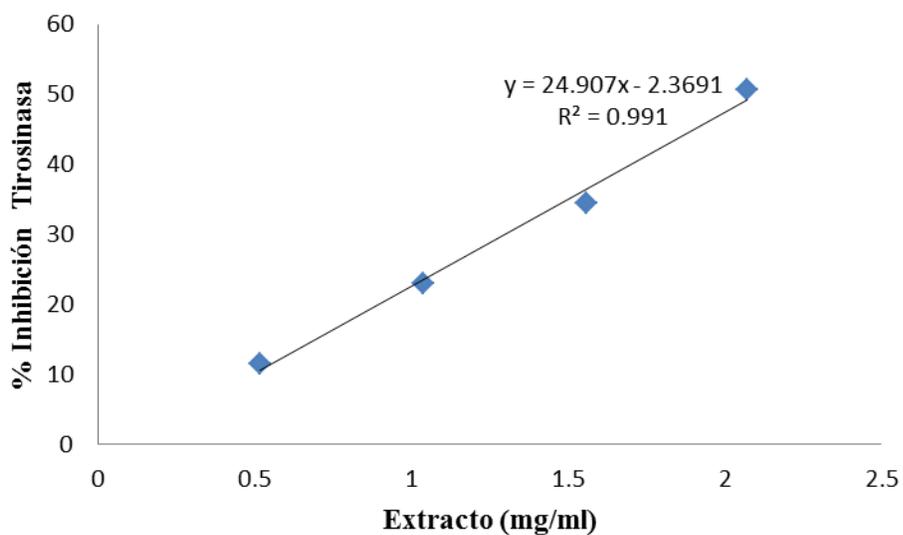
Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ del extracto Etanol – Fruto Verde

Extracto (mg/ml)	%Inhibición de Tirosinasa
0.42	9.1
1.26	21.2
2.53	49.5
4.2	69.2



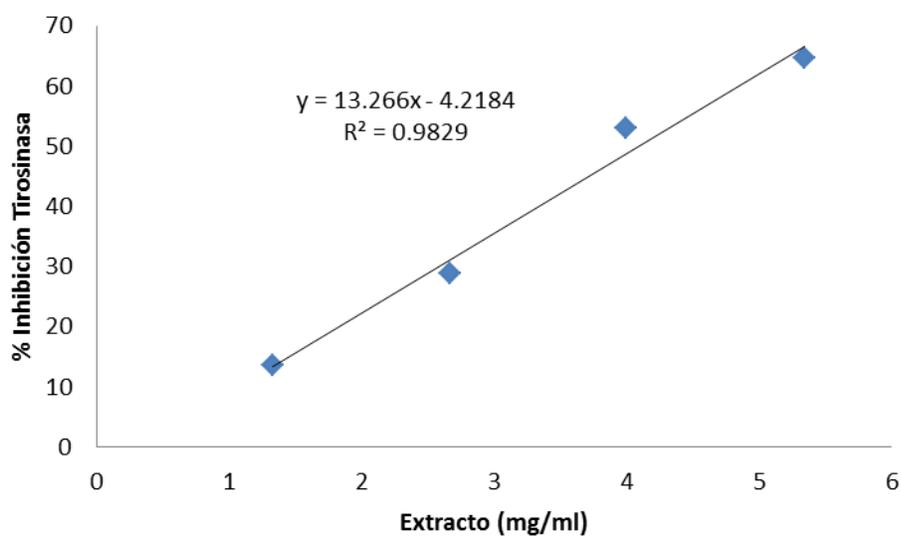
Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ del extracto Metanol – Fruto Verde

Extracto (mg/ml)	%Inhibición de Tirosinasa
0.52	11.6
1.04	23
1.56	34.5
2.07	50.7



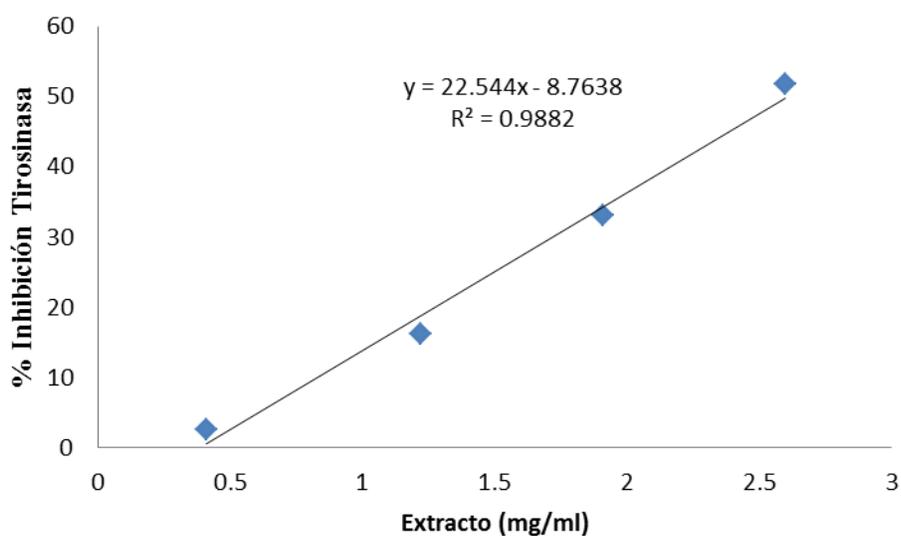
Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ del extracto Metanol – Tallo

Extracto (mg/ml)	%Inhibición
1.33	13.6
2.67	28.8
4	53
5.34	64.6



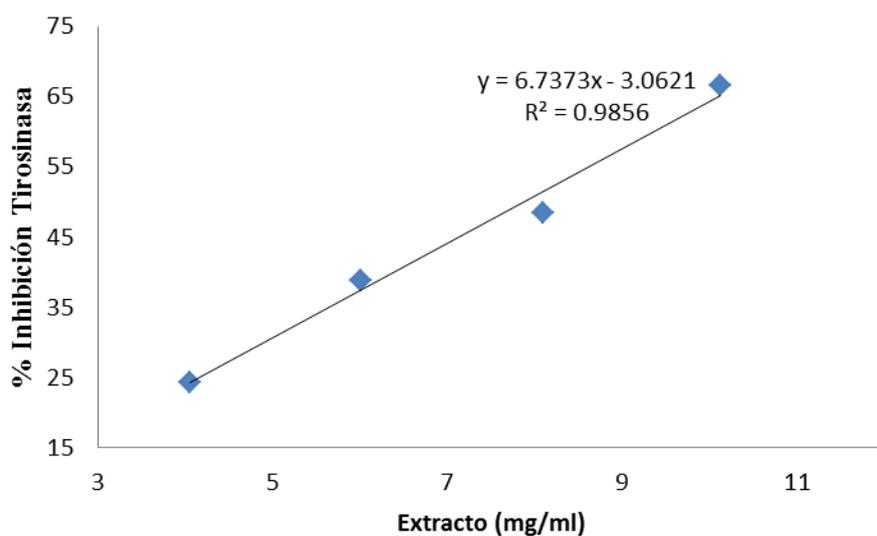
Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ del extracto Acetato de etilo – Fruto Verde

Extracto (mg/ml)	%Inhibición
0.41	2.5
1.22	16.1
1.91	33
2.6	51.7



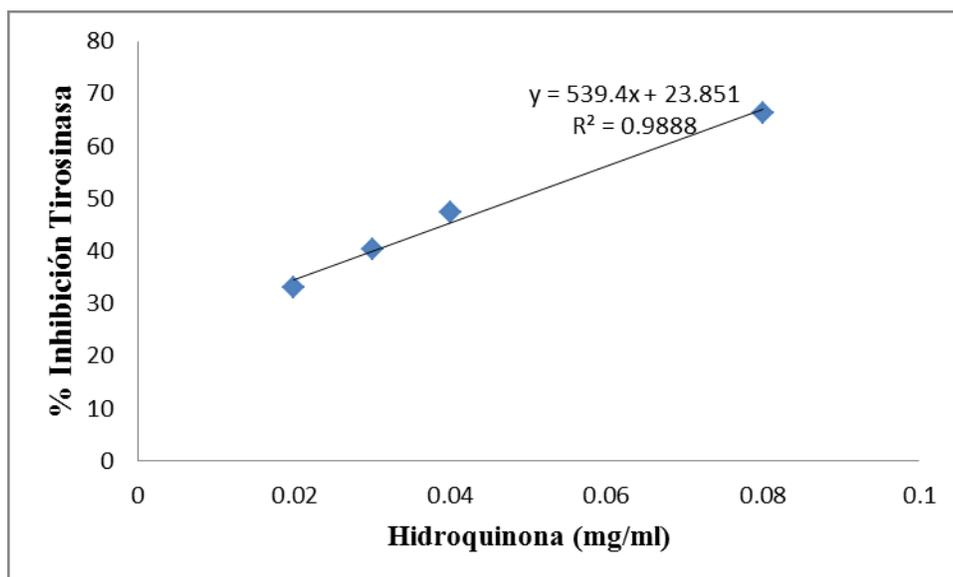
Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ del extracto Hexano – Fruto Maduro

Extracto (mg/ml)	%Inhibición
4.05	24.2
6.01	38.9
8.1	48.5
10.12	66.7



Análisis de regresión lineal para determinar el valor IC₅₀ del extracto Hidroquinona

Extracto (mg/ml)	%Inhibición
0.02	33.1
0.03	40.3
0.04	47.4
0.08	66.3



Apéndice I

Productividad

Los resultados de la presente tesis se han presentado en los siguientes foros especializados:

En el XXXIV Encuentro Nacional y III Congreso Internacional de la AMIDIQ Mazatlán, Sinaloa, México 7 al 10 de Mayo del 201, en la modalidad de poster.

En el XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería celebrado del 23 al 28 de Junio de 2013 en Cancún, Quintana Roo, en la modalidad de poster.

En el Congreso Internacional del IFT “Anual Meeting & Food Expo” celebrado del 13 al 16 de Julio 2013 en la ciudad de Chicago, Illinois USA en la modalidad de poster.

México D.F. a 19 de Agosto del 2013

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**IDENTIFICACIÓN DE EXTRACTOS DE FUENTES NATURALES CON
ACTIVIDAD INHIBITORIA DE TIROSINASA**

que presentó

Q.A. Frida Monserrat Hosanna Paredes Ruiz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

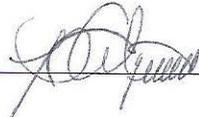
Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor: Dr. Ángel Miliar García

Jurado:

Presidente:

Dra. Edith Ponce Alquicira



Secretario:

Héctor Bernardo Escalona Buendía



Vocal:

Ángel Miliar García



Vocal:

Gerardo Díaz Godínez

