

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**ACTIVIDAD ANTITROSINASA DE OCHO ESPECIES DE
PLANTAS NATIVAS DE MESOAMÉRICA USADAS EN
APLICACIÓN DÉRMICA**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Presentado por

**AMANDA MARGARITA AGUSTÍN GÓMEZ
MORAMAY DE LOS ÁNGELES CALDERÓN ARIAS
AXEL ERNESTO MARTÍNEZ CASTELLANOS
JEREMY OMAR ORTIZ JUÁREZ**

Para optar al título de

QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, ABRIL 2015

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M. A.	Secretaria
Licda. Miriam Carolina Guzmán Puilo	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores De León	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Quien nos dio la vida y nos permitió alcanzar esta meta, guiándonos en todo momento y darnos la fortaleza para seguir adelante.

A NUESTROS PADRES

Que con sus esfuerzos nos dieron la oportunidad de estudiar y han sido el apoyo incondicional en cada etapa de nuestra vida y definitivamente sin su ayuda este logro no sería posible.

A NUESTRAS FAMILIAS

Por ser parte de este proceso y porque siempre han sido fuente de inspiración y motivación.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

En especial a la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, por ser nuestra alma mater, que nos llenó de conocimientos técnicos, científicos y sociales y a la vez enseñarnos valores morales y éticos, por permitirnos tener amigos y porque nos está dando la oportunidad de ser ciudadanos útiles a nuestra sociedad.

A LAS INSTITUCIONES

En especial al Fondo para el Desarrollo Científico y Tecnológico (FODECYT) por el financiamiento del estudio, al Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología y al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) por permitirnos desarrollar la parte experimental de la investigación en sus instalaciones y al Departamento de Bioestadística por el asesoramiento en la parte estadística de la investigación.

A LOS PROFESIONALES

Que de una u otra forma colaboraron directa o indirectamente en nuestra formación como profesionales, en especial al Lic. Armando Cáceres y a la Licda. Ana Margarita Paz por su asesoramiento en la realización del estudio.

ÍNDICE

I.	ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	5
II.	RESUMEN	6
III.	ANTECEDENTES	7
	A. Pigmentación de la piel	7
	B. Hiperpigmentación.....	8
	C. Trastornos por hiperpigmentación	9
	D. Bioquímica de la hiperpigmentación	13
	E. Sustancia blanqueadoras	15
	F. Actividad vegetal inhibitoria de la tirosinasa.....	17
	G. Plantas del estudio.....	21
	H. Metodologías para la determinación de la actividad de tirosinasa	40
IV.	JUSTIFICACIÓN	48
V.	OBJETIVOS	49
	A. General	49
	B. Específicos	49
VI.	HIPÓTESIS	50
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
	A. Materiales.....	51
	B. Metodología	55
	C. Diseño de la investigación	60
VIII.	RESULTADOS	65
	A. Colecta y obtención de extractos	65
	B. Estandarización de los métodos	67
	C. Determinación de actividad antitirosinasa en extractos vegetales	68
IX.	DISCUSIÓN	71
X.	CONCLUSIONES	76
XI.	RECOMENDACIONES.....	77
XII.	REFERENCIAS	78
XIII.	ANEXOS	94

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La hiperpigmentación dérmica es el resultado de la sobreactividad de la enzima tirosinasa, la cual cataliza la conversión de la fenilalanina en L-DOPA, compuesto precursor de la melanina. Constituye una problemática a nivel cosmético y de salud, por lo que actualmente existe un gran interés en investigar productos con propiedades que permitan establecer una solución a desórdenes de la piel relacionados (Vázquez & Moreno, 2004).

Este estudio se centró en la evaluación y determinación de la capacidad de inhibir la tirosinasa a partir de extractos provenientes de ocho plantas nativas de Mesoamérica que, por distintas investigaciones y revisiones anteriores, se sabe que tienen un papel importante en el campo de la farmacología ya que han sido utilizadas comúnmente para la elaboración de productos cosméticos o para tratar afecciones de la piel.

Este proyecto forma parte de la investigación y evaluación que se realiza en la unidad de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), en donde se llevan a cabo estudios sobre plantas y sus diferentes propiedades mediante diferentes procedimientos fitoquímicos. Forma parte también de un proyecto de Fondo para el Desarrollo Científico y Tecnológico (FODECYT 17-2009).

II. RESUMEN

La hiperpigmentación de la piel es una de las principales causas de consulta dermatológica y preocupación cosmética. Esta afección se encuentra relacionada con la tirosinasa, una enzima que participa activamente en la pigmentación de la piel. Actualmente la búsqueda de agentes inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa representa gran interés para el tratamiento de la hiperpigmentación.

El principal objetivo del presente estudio fue estandarizar metodologías para evaluar la actividad antitirosinasa de extractos vegetales y poder encontrar nuevos agentes despigmentantes de la piel. Se evaluaron extractos diclorometánicos y metanólicos de ocho plantas nativas de Mesoamérica (*Dorstenia contrajerva*, *Lippia graveolans*, *Litsea guatemalensis*, *Phlebodium pseudoaureum*, *Vernonia deppeana*, *Byrsonima crassifolia*, *Gliricidia sepium* y *Smilax domingensis*), las cuales han sido utilizadas popularmente para tratar afecciones dérmicas.

Se estableció la metodología para la evaluación cualitativa mediante cromatografía en capa fina, con un nivel de significancia de $\alpha=0.1$ y $p=0.5$; y una prueba cuantitativa por espectrofotometría con un intervalo de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

Ninguno de los extractos del estudio presentó actividad antitirosinasa en las dos técnicas utilizadas en el estudio.

III. ANTECEDENTES

A. Pigmentación de la piel

La pigmentación cutánea está originada por la combinación de cuatro pigmentos localizados en la dermis y epidermis:

1. Hemoglobina oxigenada de arteriolas y capilares.
2. Hemoglobina desoxigenada de vénulas.
3. Depósitos de carotenos o bilis no metabolizada, así como en otros pigmentos exógenos (medicamentos, metales, etc.).
4. Melanina epidérmica (principal componente del color de la piel) (Arenas, 1996).

El color normal de la piel está determinado por la actividad de los melanocitos, que se localizan entre los queratinocitos de la capa basal de la epidermis. Estas células sintetizan melanina, principal componente del color de la piel y determinante en las diferencias pigmentarias raciales; su función principal es la absorción de la radiación ultravioleta. La melanina es transferida a través de las dendritas de los melanocitos a los queratinocitos vecinos, mediante fagocitosis de los melanosomas en los que ésta se almacena. No hay diferencias significativas en la densidad de melanocitos entre unas razas y otras, sino las diferencias de color son debidas a variaciones en la cantidad y tamaño de los melanosomas y a la forma en que se agrupan, distribuyen y degradan dentro de los queratinocitos (Leis, Arranz & Díaz, 2010; Vásquez & Moreno, 2004).

B. Hiperpigmentación

La hiperpigmentación es una de las principales causas de consulta dermatológica y preocupación cosmética. Se caracterizan por ser enfermedades de tratamiento decepcionante, el que incluirá tanto medidas farmacológicas, fundamentalmente tópicas, como terapéuticas físicas y eventualmente de administración oral (Lim, Lim, & Yule, 2009).

Los tratamientos disponibles en la actualidad suelen presentar riesgo de irritaciones, a veces importantes como en el caso de las descamaciones profundas, e incluso pueden provocar hiperpigmentaciones postinflamatorias, por lo que deben ser individualizados y controlados por el médico. Los inhibidores de la tirosinasa son agentes químicos capaces de reducir reacciones enzimáticas, como la melanización y el oscurecimiento de la piel (Lim, Lim, & Yule, 2009; Leis, Arranz & Díaz, 2010).

Las discromías con hiperpigmentación son un grupo heterogéneo de enfermedades de etiologías múltiples, a veces no bien determinadas, y de difícil tratamiento, no exento de posibles efectos secundarios. Se caracterizan evidentemente por la presencia de máculas de un color más oscuro que la piel sana. Se pueden clasificar de acuerdo a distintos criterios:

1. Congénitas, como la hiperpigmentación presente en la incontinencia pigmentaria o adquiridas que es lo usual.
2. Según su distribución, pueden ser circunscritas o difusas como en algunas enfermedades sistémicas (enfermedad de Addison).

3. Por su causa pueden ser idiopáticas y aparecer sin ningún antecedente de interés, de origen melanínico o por depósito de otras sustancias, como carotenos, amiloide, sustancias pigmentadas de origen externo (tatuajes), etc. (Leis, Arranz & Díaz, 2010).

C. Trastornos por hiperpigmentación

1. Melasma

El melasma o cloasma es una hipermelanosis adquirida circunscrita, parcheada, simétrica, que afecta a zonas fotoexpuestas. Clínicamente se manifiesta con máculas irregulares de color marrón, más o menos oscuras, distribuidas por la frente, sienes, labio superior y mejillas. Es más frecuente en mujeres, sobre todo hispanas y orientales que viven en zonas con alta exposición solar (Victor, Gelber & Rao, 2004).

Hay muchos factores etiológicos implicados siendo el más importante la exposición solar, hay cierta predisposición genética y se han relacionado aspectos hormonales como el embarazo (de un 50-70% de las mujeres gestantes tienen melasma durante el embarazo). Se atribuye también la toma de anticonceptivos, disfunciones tiroideas, así como algunas medicaciones tales como anticonvulsivantes y fármacos fotosensibilizantes y al uso de ciertos cosméticos (Moin, Jabery & Fallah, 2006).

El tratamiento se basa en una fotoprotección solar estricta y en la utilización de sustancias blanqueadoras. El principal fármaco utilizado es la hidroquinona, que es un compuesto hidroxifenólico que inhibe la tirosinasa reduciendo la conversión de L-DOPA a melanina; es

usada habitualmente a concentraciones del 2-4%, aunque se puede formular a mayor concentración y añadir retinoides para aumentar su penetración y corticoides para evitar la irritación y mejorar la tolerancia. Otros productos tópicos utilizados son el ácido kójico, el ácidoazelaico o la arbutina. En casos más resistentes se puede recurrir a tratamientos con descamaciones láser, que muestran respuesta variable (Alster 2001; Draelos 2007; Hadler, 2004).

2. Hiperpigmentación postinflamatoria

Tras la resolución de algunos procesos inflamatorios cutáneos puede aparecer una hiperpigmentación en la zona. Es más frecuente en fototipos altos y al menos dos procesos principales están involucrados en la aparición de esta pigmentación. En primer lugar y debido a la liberación de mediadores de la inflamación, aumenta la actividad de los melanocitos, produciendo más melanina y transfiriendo más melanosomas a los queratinocitos. Por otra parte, al dañarse la capa basal hay un fenómeno de incontinencia pigmentaria con aparición de melanófagos en la dermis (Lacz, 2004).

Aunque cualquier proceso inflamatorio endógeno o exógeno cutáneo puede desembocar en una hiperpigmentación postinflamatoria, los más habituales son el liquen plano, el acné, las reacciones farmacológicas, el lupus eritematoso y las quemaduras (Lacz, 2004).

Este tipo de hiperpigmentación suele resolverse conforme el proceso original vadesapareciendo, aunque los casos con exceso de pigmento en la dermis son más resistentes. En estos casos puede intentarse acelerarse el aclarado con productos despigmentantes como la

hidroquinona, con retinoides, descamaciones con ácido glicólico o láser. El tratamiento es eficaz en aquellos casos con el pigmento en la epidermis (Stratigos & Katsambas, 2004).

3. Amiloidosis cutánea

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades en las que se deposita amiloide en el espacio extracelular de diferentes tejidos. Las formas primarias cutáneas cursan con hiperpigmentación. La amiloidosis macular se presenta en forma de máculas pardas confluentes en un patrón ondulado, fundamentalmente localizadas en la región interescapular y en las caras de extensión de los brazos. El liquen amiloideo cursa con pequeñas pápulas queratósicas, pruriginosas, del color de la piel normal o marrones, localizadas en las caras de extensión de las extremidades (especialmente en regiones pretibiales) (Stratigos & Katsambas, 2004).

El procedimiento diagnóstico inicial consistirá en una biopsia de piel que incluya grasa subcutánea, la cual es positiva en 80% de los casos. Si la biopsia resulta negativa, el siguiente paso consiste en la práctica de una biopsia de la mucosa rectal, que es positiva en 70% de los casos. Si tras estos procedimientos no se llega al diagnóstico, se practicará una biopsia del órgano presumiblemente afectado. El tratamiento de las amiloidosis cutáneas es poco satisfactorio. El roce crónico de la zona puede acentuar la pigmentación, por lo que debe evitarse. Los corticoides tópicos pueden aliviar la comezón, pero generalmente no consiguen eliminar la hiperpigmentación ya que persiste el depósito de amiloide. Se han comunicado casos aislados de tratamientos con fototerapia, dermoabrasión, etretinato, ciclofosfamida, láser, dióxido de carbono (CO₂), crioterapia o cirugía entre otros, con resultados variables (Grateau, 2000; Stratigos & Katsambas 2004).

4. Hiperpigmentación por fármacos

Representa del 10-20% de las pigmentaciones adquiridas y hay una extensa lista de fármacos implicados. Los mecanismos por los que un fármaco puede provocar una coloración más oscura de la piel son varios: posterior a una inflamación inespecífica [carmustina (biscloronitrosourea, BCNU), metotrexato, tras una reacción de fotosensibilidad, hidroxiquina], por aumento de actividad de los melanocitos y/o un aumento de su número [bleomicina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante de melanocitos (MSH), doxorubicina, psoralenos], por depósito del propio fármaco o formación de complejos con melanina (sales de oro, bismuto, plomo, arsénico, hierro, cloroquina, amiodarona, fenotiacina, clorpromacina, imipramina), por depósito de hierro por daño vascular dérmico o bien por combinaciones de estos mecanismos (Dereure, 2001).

La pigmentación puede estar circunscrita al lugar de aplicación del fármaco, a áreas fotoexpuestas (metotrexato, oro, plata, amiodarona, dioxinas, psoralenos, algunos psicofármacos), en piel lesionada (mecloretamina, minociclina, closufacimina), o bien de forma difusa, pudiendo ser más intensa en zonas de presión o pliegues (busulfán, bleomicina en forma de lesiones lineales en el tronco, hidroxiquina), y puede afectar también a mucosas o agregados cutáneos (zidovudina en uñas, ciclofosfamida, doxorubicina, oro, plata, plomo, minociclina) (Stratigos & Katsambas, 2004).

Lo habitual es que la pigmentación se vaya aclarando gradualmente al retirar el fármaco implicado. Así, el primer paso en el tratamiento es buscar el producto implicado y retirarlo si es posible (Dereure, 2001).

D. Bioquímica de la hiperpigmentación

Los melanocitos son células encargadas de la síntesis de melanina, los cuales migran en forma de melanoblasto a través de la dermis hasta llegar a la capa basal de la epidermis, folículos pilosos, mucosas, úvea, capa pigmentaria de la retina, leptomeninges y la estría vascular del oído interno, convirtiéndose en melanocitos durante su migración (Ferrandiz, 2001).

El rasgo característico de los melanocitos respecto a otras células del organismo es un orgánulo citoplasmático especial conocido como melanosoma en el cual se forma la melanina, por acción de la enzima tirosinasa. El melanosoma es un polímero de estructura no definida y su cantidad variará dependiendo la zona cutánea. El proceso de síntesis de los melanosomas, su melanización y transferencia a los queratinocitos se denomina melanogénesis, proceso complejo regulado principalmente por la luz ultravioleta, por estímulos hormonales y por factores hereditarios (Ferrandiz, 2001).

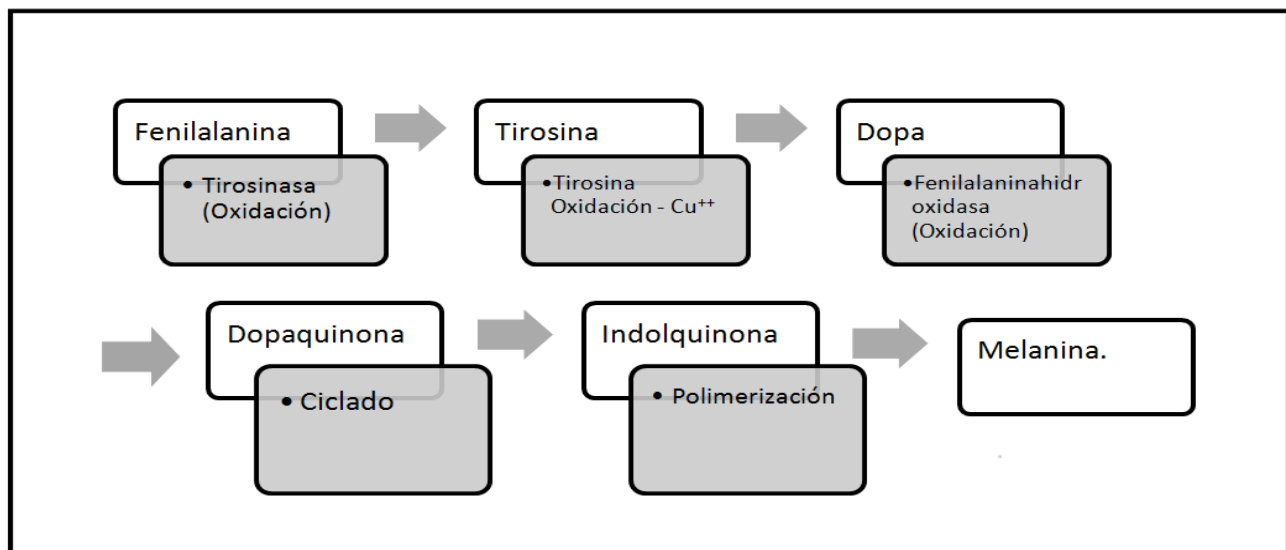
La melanogénesis tiene lugar en el interior de los melanosomas (feomelanosomas si contiene feomelanina y eumelanosomas si contienen eumelanina), a partir de la tirosina. Una sucesión de oxidaciones de tirosina catalizada por la tirosinasa conduce a la síntesis de L-DOPA (dihidroxifenilalanina) para producir, a continuación, un compuesto intermediario común: la dopaquinona. A partir de este punto, dos vías distintas conducen a la formación de las eumelaninas y de las feomelaninas (Fitzpatrick & Mosher, 1987).

La intensidad de la pigmentación depende de varios factores, tales como la cantidad de melanina total producida e incorporada a los melanosomas, así como la degradación de estos, su

distribución en zonas diferentes de la capa basal de los queratinocitos y el grado de dispersión o agregación de los melanosomas en el interior de los queratinocitos (Fitzpatrick & Mosher, 1987).

El número total de melanocitos por unidad de superficie es igual en las distintas razas. Se ha de tener en cuenta que las diferencias pigmentarias raciales no provienen del número de melanocitos sino de las diferencias funcionales de estos (Arenas, 1996).

Figura 1: Reacción química de la síntesis de la melanina a partir de fenilalanina, precursor principal de la tirosina.



Fuente: Ferrandiz, 2001.

El mecanismo exacto de hiperpigmentación es desconocido, pero se han discutido varias hipótesis. La deficiencia de vitamina B12 podría causar una disminución de glutatión intracelular reducido y resultaría en un incremento en la actividad de la tirosinasa y permitiría un incremento en la melanogénesis. El fenómeno de hiperpigmentación asociado a deficiencia de B12 es

paradójico, por cuanto deficiencias similares han sido asociadas al cuadro clínico opuesto, es decir vitiligo (Hoffman, 2003; Noppakun & Swadikul 1986; Pearl, 2006).

E. Sustancia blanqueadoras

Empíricamente se ha comprobado que existen varias sustancias capaces de despigmentar las zonas afectadas de la piel, que basan su función sobre las vías metabólicas que permiten alcanzar dichos resultados, sin llegar a determinar cuál es la indicada (Ribot, 2006).

Los dos caminos de elección para lograr estos cambios, se basan en decolorar directamente la melanina ya formada, o bien prevenir la formación de nueva melanina actuando sobre la vía metabólica de síntesis mediante la inhibición de la capacidad tirosinasa o la introducción de competidores de la tirosina. Las tendencias de la cosmética actual contemplan ambas posibilidades (Ribot, 2006).

Existen otros mecanismos de acción de los agentes despigmentantes los cuales son mediante la inhibición de la síntesis de ADN en los melanocitos hiperactivos, reducción del contenido de melanina epidérmica y engrosamiento de la epidermis (capa granular) (Prignano, Ortonne, Buggiani & Lotti, 2007).

Tabla 1: Sustancias despigmentantes usadas con mayor frecuencia en el tratamiento de la hiperpigmentación cutánea.

Sustancia	Función
Peróxido de hidrógeno	Incorporado a una crema, oxida la molécula de melanina a formas menos coloreadas, es un tipo de formulación antigua y poco estable.
Hidroquinona	Se utiliza en cosmética a dosis no superiores al 2% debido a su baja tolerancia cutánea. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la conversión de dopa a la melanina por medio de la tirosinasa.
Ácido ascórbico	Es un agente antioxidante que afecta a la melanogénesis al reducir la o-dopa-quinona de DOPA. Además, impide la producción de los radicales libres y la absorción de los rayos ultravioletas. Sin embargo, el ácido ascórbico es muy inestable, ya que rápidamente se oxida y se descompone fácilmente en solución acuosa.
Glutación	Molécula formada por la unión de tres aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Además de sus numerosas funciones biológicas, el glutatión tiene una actividad antimelanogénica o despigmentante como consecuencia de la inactivación directa de la tirosinasa por unión al ión Cu^{2+} el centro activo de la enzima. Se incorpora en concentraciones del 0.1%, no se suele formular como único principio activo sino que se asocia a otros despigmentantes.
Panteteína y derivados	Tienen propiedades antitirosinasas, las más utilizadas son la monobutanoil panteteína y panteteína-5-sulfonato cálcico.
Ácido azelaico	El ácido azelaico se utiliza para tratar el acné y el melasma. Tiene efectos selectivos sobre los efectos hiperactivos y melanocitos anormales en la piel y un mínimo efecto sobre la pigmentación normal humana, pecas y lentigos seniles. Se informa a ser tan eficaz como la hidroquinona al 4 %.
Luteolin 7-glucósido	Posee actividad antitirosinasa, se obtiene a partir de la <i>Achilea millefolium</i> .
Melatonina	También con actividad antitirosinasa, protegido por una patente de Shiseido.
Ácido kójico	Actualmente es uno de los despigmentantes más recetados por los dermatólogos. Se utiliza el ácido y sus derivados a concentraciones del 2% dando buenos resultados.

Fuente: Ribot, 2006; Paul & Rose, 2009; Picardo & Carrera, 2007.

F. Actividad vegetal inhibitoria de la tirosinasa

El interés en desarrollar productos despigmentantes también tiene un trasfondo social, por ejemplo en Asia oriental, la mayoría de las mujeres quieren tener la piel más blanca, para satisfacer este deseo muchas empresas cosméticas han desarrollado agentes activos inhibidores de la melanogénesis, con el fin de usarlos en productos cosméticos para blanquear la piel. Debido a este entorno se han realizado varios estudios con el fin de desarrollar tratamientos blanqueadores de la piel que sean eficaces utilizando materiales naturales que den solución a los trastornos de hiperpigmentación cutánea (Kubo & Matsuda, 1995).

Una de las opciones que más se está investigando en la actualidad es la actividad inhibitoria de la tirosinasa (AIT), por productos químicos o naturales. Los primeros trabajos sobre la búsqueda de productos vegetales con AIT datan de los años 90. Lee, Kim y Kim, (1997) publicaron un estudio el cual tuvo como objetivo evaluar varios extractos de plantas con el fin de desarrollar inhibidores de la melanogénesis. En este estudio, se tamizaron 100 extractos vegetales para dilucidar sus efectos blanqueadores utilizando la inhibición *in vitro* de tirosinasa de hongo y la actividad de auto oxidación de DOPA. En sus resultados presentaron que once extractos de las plantas estudiadas: *Agastache rugosa*, *Bupleurum falcatum*, *Chaenomeles speciosa*, *Dryopteris crassirrhizoma*, *Gastrodia ellata*, *Glycyrrhiza glabra*, *Morus alba*, *Phellodendron amurense*, *Pinellia ternata*, *Rheum palmatum*, *Sophora japonica*, mostraron una AIT mayor del 50%, siendo *M. alba* y *G. ellata* las especies que presentaron mayor actividad (85%).

Un estudio para evaluar algunas plantas tropicales para determinar la AIT, incluyeron 67 especies que pertenecen a 38 familias. Los resultados demostraron que los extractos de 55 plantas

presentaron una pobre AIT (menos del 50%) en comparación con un control positivo que fue *M. alba*. Cinco de las plantas estudiadas, *Stryphnodendron barbatimao*, *Portulaca pilosa*, *Cariniana brasiliensis*, *Entada africana* y *Prosopis africana*, inhibieron más del 90% de la actividad de la tirosina. Los autores determinaron que la presencia de deoxiresveratrol (2,3',4,5'-tetrahidroxiestilbenceno) en los extractos vegetales parece justificar la alta inhibición de la tirosinasa (Baurin, Arnoult, Scior, Do & Bernard, 2002).

En 2003 se publicaron los resultados de otra investigación acerca de los efectos inhibitorios de algunos flavonoides sobre la actividad de la tirosinasa, estudiando el potencial de inhibición de compuestos como: galangina, quercetina, morina, y luteolina, muchas de ellas presentes en las plantas de este estudio. A través de un análisis cinético demostraron que los flavonoides son inhibidores competitivos, mientras que la luteolina es un inhibidor no competitivo. El orden de potencial de inhibición fue el siguiente: quercetina, galangina, morina y luteolina (Xie, Chen, Huang, Wang & Zhang, 2003).

La investigación fitoquímica del extracto de metanol de *Vitex negundo*, que presentó AIT determinó que esta actividad es causada por ocho lignanos fenólicos los cuales fueron aislados e identificados como: negundin B, 6-hidroxi-4-(4-hidroxi-3-metoxi)-3-hidroximetil-7-metoxi-3,4-dihidro-2-naftaldehído, vitrofolal E, (+)-lioniresinol, (+)-lioniresinol-3 α -O- β -D-glucosido, (+)-(-)-pinoresinol y (+)-diasiringaresinol. El compuesto que presentó mayor actividad antitirosinasa fue el lignano (+)-lioniresinol-3 α -O- β -D-glucosido (Azhar-ul-Haq, et. al., 2006).

De la corteza de *Punica granatum*, se purificó una fracción de polisacárido que inhibían el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), azino-bis 2.2 (ácido 3-etilbenzthiazolin-6-sulfónico)

(ABTS) y la tirosinasa. Estos fueron analizados y se determinó que a 10g/mL de corteza de *P. granatum* la actividad de la tirosinasa fue inhibida de forma no competitiva en un 43%, esta inhibición es independiente de la concentración (Rout & Banerjee, 2007).

El ácido elágico presente en los extractos metanólicos de *Juglans regia*, *Castanea sativa* y *Eucalyptus camaldulensis*, demostró poseer actividad inhibitoria de la tirosinasa mayor al 50%. La eficacia del ácido elágico se comparó con arbutina y éter monometílico de hidroquinona como sustancias de referencia y se encontró que era un supresor más eficiente de la pigmentación. El efecto inhibitorio de *J. regia* fue de 1.2 veces mayor que la de *E. camaldulensis* y 1.8 veces mayor que la de *C. sativa*. Además se probó el efecto inhibitorio de los extractos combinados y se encontró un efecto de sinergismo aumentando la AIT a un 66.6% (Özer, Mutlu & Kırçak, 2007).

En un estudio sobre propiedades antioxidantes y fenoles totales de hojas y rizoma de especies de *Zingiberaceae*, se analizaron cinco especies de *Etilingera* para determinar su AIT comparada con un control positivo de *Hibiscus tiliaceus* que presentó un 43.9% de actividad inhibitoria. Los extractos de hojas de las especies de *Etilingera* presentaron AIT siendo *E. elatior* el que presentó la mayor actividad (55.2%) seguida por *E. fulgens* (49.3%), *E. maingayi* (42.6%), *E. rubrostriata* (29.5%) y *E. littoralis* (22.0%) (Chan, et. al., 2007).

Los extractos etanólicos de las especies de bambú de Malasia *Gigantochloa ligulata* y *Schizotachyum zollingeri* poseen alta AIT (98.9 y 100% respectivamente) usando concentraciones de 1.0mg/mL. Estos extractos activos tienen la capacidad de inhibir la vía catalítica de la biosíntesis de melanina y por lo tanto se cree que podría aplicarse como material

de productos cosméticos para blanquear la piel. En este estudio se determinó que el compuesto fenólico principal fue el ácido cumárico (Mohd, et. al., 2008).

En los extractos metanólico y acetónico de *Sideroxylon inerme* a una concentración de 200µg/mL tiene 70% de AIT, los compuestos aislados de estos extractos fueron el epigallocatequin galato (EGCG) y procianidina B1, ambos tienen fuerte función antioxidante (Momtaz, et. al., 2008).

En los extractos metanólicos de hojas de cuatro especies de *Macaranga*(*M. gigantea*, *pruinosa*, *tanarius* *ytriloba*) conocidas previamente por poseer AIT se determinó que *M. pruinosa* presenta la actividad inhibidora más alta de las cuatro especies (61.2%), las otras tres especies estudiadas presentaron actividad mayor al 50% (Lim, Lim, & Yule, 2009).

En una investigación con 91 plantas nativas del centro de Argentina con el objetivo de encontrar nuevas fuentes de compuestos con AIT se obtuvieron extractos de *Achyrocline satureioides*, *Artemisia verlotiorum*, *Cotoneaster glaucophylla*, *Dalea elegans*, *Flourensia campestris*, *Jodina rhombifolia*, *Kageneckia lanceolata*, *Lepechinia floribunda*, *Lepechinia meyenii*, *Lithrea molleoides*, *Porlieria microphylla*, *Pterocaulon alopecuroides*, *Ruprechtia apetala*, *Senna aphylla*, *Sida rhombifolia*, *Solanum argentinum*, *Tagetes minuta* y *Thalictrum decipiens*, demostrando más del 90% de AIT, *D. elegans*, *L. meyenii* y *L. molleoides* son los extractos con mayor actividad. Se aisló el compuesto activo (Z,Z)-5-(trideca-4,7-dienil)-resorcinol, que es el responsable de inhibir la actividad de la tirosina (Chiari, Joray, Ruiz, Palacios & Carpinella, 2010).

Apartir de las hojas de *Michelia albase* aisló el compuesto (-)-N-formilanonaina el cual demostró tener AIT de hongo y melanocito humano mayor al 50% sin citotoxicidad aparente a las células humanas. Este compuesto también tiene actividad antioxidante (Wang, et. al., 2010).

G. Plantas del estudio

Basados en el uso popular en diversas aplicaciones en dermatología, se seleccionaron ocho especies vegetales que a continuación se describen:

1. *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth.

a. Nombre popular

Nance,chi, craboo, nanche, nanzin, tapal, zacpah (Bultman & Charles, 1976).

b. Sinonimia

B. cinerea Dec, *B. cotinifolia* Kunth, *B. cubensis* Juss, *B. ferruginea* Kunth, *B. karwinskiana* Juss, *B. pulchra* DC, *B. rufescens* Bertol, *B. laurifolia* Kunth, *B. var. guatemalensis* Niedenzu, *Malpighia crassifolia* (Standley & Steyermark, 1946).

c. Descripción botánica

Árbol de 3-10m de alto, copa redondeada o extendida, tronco recto, corteza café, rugosa, rosada por dentro. Hojas siempre verdes, opuestas, ovaladas, 5-20cm de largo, puntiagudas. Flores de 5 pétalos, anaranjadas o amarillas, numerosas, en grupos. Frutos en drupa carnosa, 8-

22mm de diámetro, portados aisladamente en racimos, piel delicada, amarilla; carnaza blanca, jugosa, ácida, olor peculiar; una semilla negra muy dura (Standley & Steyermark, 1946).

d. Origen y distribución

Nativo de México a Sur América y Caribe en bosques secos y tropicales hasta 1,800msnm. Se ha descrito en la mayoría de zonas cálidas de Guatemala como Chiquimula, El Progreso y Escuintla (Standley & Steyermark, 1946).

e. Usos populares en dermatología

Por vía tópica se usa para tratar afecciones dermatomucosas (estomatitis, leucorrea, piodermia, tinea, úlcera, vaginitis) y tumores. Se le atribuye propiedad acaricida, antifúngica, astringente, cicatrizante y desinflamante (Cáceres, 1996; Duke, 1985).

f. Actividad farmacológica y toxicológica

Los responsables de la actividad farmacológica son los galatos de proantocianidinas β_2 , que en este caso se utilizan como antifúngicos, antiinflamatorios y nematicidas. La corteza es el órgano más activo contra bacterias y el etanol el mejor disolvente por bioactividad y rendimiento. El extracto con acetato de etilo de la raíz tiene potente actividad (Martínez, Cazare, García, González & Moreno, 1999).

A la corteza se le atribuye cierta toxicidad, pero no hay estudios específicos. Los extractos acuosos y etanólicos de hojas, corteza y raíz son tóxicos a peces del género *Mollinesia*. La infusión de corteza por vía oral en ratón no tiene toxicidad aguda en dosis de 1-5g/kg (Duke, 1985).

g. Composición química

La corteza contiene taninos (20-30%), glucósidos, flavonoides, saponinas, sesquiterpenlactonas y triterpenos (β -amirina). Las hojas contienen saponinas, esteroides insaturados (β -sitosterol), cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides (catequina, epicatequina, guayaverina, hiperina, quercetina, galoilgalactósido), leucoantocianinas, taninos, polifenoles, triterpenoides (birsonimol); terpenos (betulinaldehído, betulina, lupeol), éster aromático (metilgalato) y glicolípidos (Cáceres 1996; Béjar & Malone, 1993).

2. *Dorstenia contrajerva* L.

a. **Nombre popular**

Contrahierba, mano de león (Quetzaltenango), hierba de sapo (Petén), cambahan (Petén), contaúl (Chimaltenango), contrahierba, contrayerba, (Costa Rica), tozpatli (México), contrahierba, crestilla, mano de león, cresta de gallo (México), moukape (Nicaragua), taropé, higuerrilla, (Standley & Steyermark, 1946; Ocampo & Balick, 2009).

b. **Sinonimia**

Dorstenia alexiteria L., *D. contrajerva* subsp. *tenuiloba* Blake, *D. houstoni* L., *D. maculata* Lem., *D. palmata* (Willd.) Schult., *D. quadrangularis* Stokes, *D. quadrangularis* var. *integrifolia* Stokes, *D. quadrangularis* var. *pinnatifida* Stokes, *D. quadrangularis* var. *sinuate* Stokes (Ocampo & Balick, 2009).

c. Descripción botánica

La hierba emite una especie de tallo nudoso corto para florecer que mide alrededor de 20-30cm de altura, es ligeramente aromática con la raíz subterránea en forma de camote, color blanco, fusiforme, espesa, olorosa, nudosa con raicecillas finas. La planta tiene un fluido lechoso y sus hojas son lobuladas, pecioladas, peninervadas y pueden medir hasta 20cm. La inflorescencia es en forma de un receptáculo aplanado, del cual la superficie superior es densamente cubierta con flores minuciosas, en capítulo, unisexuales, de color generalmente verde. Origina frutos pequeños redondos de 0.25-1cm (Ayensa, 1981; Ocampo & Balick, 2009; Standley & Steyermark, 1946).

d. Origen y distribución

Crece asociada a la vegetación de manglar, sabana y selva tropical caducifolia, subcaducifolia, subperennifolia y perennifolia. Se encuentra en zonas de clima cálido y semicálido, en bosques tropicales, lugares húmedos y sombreados. Es originaria de México, habita otros lugares de Centro América desde Honduras hasta Panamá y en algunas regiones de Guatemala como Petén, Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Retalhuleu, Quetzaltenango y Huehuetenango. (Ayensa, 1981; Ocampo & Balick, 2009)

e. Usos populares en dermatología

El líquido lechoso se utiliza para curar llagas y cicatrizar heridas; para tratar la erisipela y paperones. En Perú se ha utilizado como un tónico contra la gangrena y como un antídoto para las picaduras de abeja y avispa (Ayensa, 1981; Balbachas & Rodríguez, 1990)

f. Actividad farmacológica y toxicológica

El péptido aislado de esta planta inhibe los efectos citopáticos que el VIH-1 (RF) tiene sobre la línea de celular T-linfoblastoides. El extracto metanólico de la planta muestra una potente actividad leishmanicida contra *Leishmania mexicana*. Mientras el extracto etanólico y acuoso de las hojas y la raíz, no muestra actividad inhibitoria en los cultivos bacterianos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; sin embargo se han realizado otros estudios que demuestren su actividad antimicrobiana más no antifúngica. Además, se ha utilizado la raíz por su actividad como antídoto para las mordeduras de víbora. En cuanto a la toxicidad de esta especie no hay información (Cáceres, et al., 2009).

g. Composición química

En la raíz se ha identificado el cardenólido siriogenín y en una muestra de hojas y tallos se detectó la presencia de alcaloides. También contiene aceite volátil, extractivo amargo y almidón. A lo que se puede añadir resina, ácido libre y fibra leñosa (Pereira, 1855; Ocampo & Balick, 2009).

3. *Gliricidia sepium*(Jacq.) Steud.

a. Nombre popular

Madre cacao, acacia, cacahuananche, cante, cocoite, cocoitó, desnudo florecido, madrial, madriado, matarratón, piñón florido, madera negra, raman de conejo (Standley & Steyermark, 1946)

b. Sinónimia

Galedupa pungam Blanco, *G. lambii* Fernald, *G. maculata* (Kunth) Steud, *G. maculata* (Kunth) Walp, *G. maculata* var. *Multijuga* Micheli, *G. sepium* (Jacq) Kunth, *G. sepium* (Jacq) Steud, *Lonchocarpus maculatus* Kunth, *L. sepium* Jacq, *Millettia luzonensis* Gray, *Robinia maculata* Kunth, *R. sepium* Jacq, *R. variegata* Schltl (Standley & Steyermark, 1946).

c. Descripción botánica

Árbol de 10m de alto, copa extendida, tronco de 30cm de diámetro, corteza café oscuro; ramas puberulentas de jóvenes, luego glabras. Hojas deciduas, lanceoladas, 3-7cm de largo, pinnadas, 2-15 foliolos. Flores en racimos, 5-10cm de largo, densamente floreados; cáliz puberulento o glabro, corola rosada a blanca. Vaina café oscuro, glabra, plana, 10-22cm de largo. Semillas lenticulares, café oscuro (Adjanohoun, 1985; Standley & Steyermark, 1946).

d. Origen y distribución

La especie es nativa de las zonas bajas de México y América Central. Ha sido introducida en muchas zonas tropicales y naturalizada en el norte de América del Sur, hasta Brasil, El Caribe, Hawaii, oeste de África, India, Sri Lanka, sureste de Asia incluyendo Tailandia, Filipinas, Indonesia y Australia. En México y América Central es una especie que se encuentra en área bajo los 1500 metros de elevación. Se presenta en rodales naturales en Costa Rica, Nicaragua, Honduras, El Salvador, Guatemala y Panamá (Pennington & Sarukhan, 1968; Hughes, 1987).

Además de *G. sepium* se reconocen dos especies del género *Gliricidia*, que son menos utilizadas: *G. maculata* y *guatemalensis*. La primera especie nativa de la Península de Yucatán

en México, distinguiéndose de *G. sepium* por sus flores blancas y por sus vainas y semillas pequeñas. *G. guatemalensis* es un arbusto pequeño de hasta tres metros de altura, con flores rojo-púrpura y hojas redondeadas (Pennington & Sarukhan, 1968).

e. Usos populares en dermatología

Ha sido objeto de algunos estudios *in vitro* obteniendo hallazgos relevantes en cuanto a su utilidad medicinal. En esta investigación se logró observar de manera considerable, aunque variable, su actividad fungicida y fungistática sobre microorganismos patógenos considerados causantes comunes de micosis cutáneas en seres humanos encontrando que la actividad antifúngica de uno de los metabolitos de la planta, la medicarpina, localizada principalmente en la hoja (Cáceres, Alvares, Ovando & Samayoa, 1991).

f. Actividad farmacológica y toxicológica

Tópicamente las hojas y corteza, frescas o cocidas, se aplican como lavados, compresas, emplastos o sobados sobre empeines, erisipela, impétigo, intertrigo, jiole, granos, raspones, salpullido, sarna, úlcera y otras enfermedades de la piel, como baños se aplica para el tratamiento de alergias (Cáceres, 1996).

Se determinó para el extracto etanol-agua 1:1 de las partes aéreas de la planta, una DL_{50} de 0.75g/kg, al ser administrado a ratones por vía intraperitoneal. En un estudio de toxicidad aguda, el extracto etanólico de las hojas resultó inocuo al ser administrado por vía oral a ratones; la DL_{50} fue de 5.0g/kg (Cáceres, 1996; Dhawan, Ptanik, Rastogoi, Singh & Tamdm, 1977).

g. Composición química

El análisis fitoquímico preliminar de las hojas demostró la presencia de alcaloides, esteroides y/o triterpenos, cumarionas, flavonoides, fenoles, taninos y pinitol. Se han aislado, además, bencenoides, fenilpropanoides y terpenos. Otros autores han reportado para las raíces y las hojas, la presencia de saponinas, ácidos aromáticos e isoflavonas. Un análisis preliminar de la planta completa dio resultados positivos para alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides, triterpenoides y cumarinas (Herath et al., 1998; Cáceres, 1996).

4. *Lippia graveolens* Kunth

a. Nombre popular

Orégano de monte, orégano mexicano (Cáceres, 2009).

b. Sinonimia

Lantana origanoides (Mart.) Gal., *L. berlandieri* Schauer, *Goniostachyum graveolens* Small. (Cáceres, 1996).

c. Descripción botánica

Arbusto delgado hasta 2m de alto, ramas con pubescencia cortamente pilosa. Hojas en pecíolos 5-10mm de largo, oblongas a elípticas, 2-4cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, subcordadas a la base, densamente pilosas, suaves al tacto, densamente tomentosas. Flores subglobosas a oblongas, 4-12mm de largo, brácteas ovado-lanceoladas, agudas; cáliz glandular; corola blanca, 3-6mm de largo (Ocampo & Maffioli, 1987; Standley & Williams, 1970).

d. Origen y distribución

Nativa del sur de Texas a Nicaragua, se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350msnm. Se ha descrito en Chiquimula, El Progreso y Zacapa (Cáceres, 2009; Standley & Williams, 1970).

e. Usos populares en dermatología

Tópicamente la decocción se aplica para combatir la tinea y en la cicatrización de heridas y llagas. Se le atribuyen propiedades como antioxidante, antiséptica y desinflamante (Cáceres, 1996).

f. Actividad farmacológica y toxicológica

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus pyogenes* pero inactiva contra *Haemophilus influenzae*; la infusión de hojas demostró actividad contra los mismos microorganismos. Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum*, pero inactivos contra *Cryptococcus neoformans* (Cáceres, 1999)

Los extractos acuosos y etanólico de hojas (500ppm) presentan cierta toxicidad dosis-dependiente contra peces del género *Mollinesia*. El lapachenol tiene actividad carcinogénica (Mena, 1994).

g. Composición química

El tamizaje fitoquímico de las hojas contiene: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, taninos y triterpenos, celulosa, pigmentos y elementos minerales; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocembrina, naringenina), lapachenol e iridioides (loganina, sacologanina, ácido carioptósido y logánico, lippióside) (Domínguez, Sánchez, Suárez, Baldas & González 1989; Pascual, Slowing, Carretero, Mata & Villar, 2001).

5. *Litseaguatemalensis* Mez.

a. Nombre popular

Laurel, aguarel, laurelillo, dpac-tze, sufricalla, zit-zuch (Cáceres, 1996).

b. Sinonimia

Litsea acuminatissima Lundell, *L. matudau* Lundell, *Tetranthera glaucescens* var. *subsolitaria* Maissn (Cáceres, 1996).

c. Descripción botánica

Es un árbol pequeño hasta 6m de alto, ramas delgadas, café. Hojas coriáceas, peciolo 1.5cm de largo, elíptico-lanceoladas de 8cm de largo, agudas en la base, lustrosas, glabras. Flores axilares, pedúnculo simple, solitarias de 15mm de largo, 5-11 flores; brácteas de involucreo deciduo, filamentos glabros (Cáceres, 2009).

d. Origen y distribución

Es endémico de Guatemala, crece en bosques abiertos de pino y matorrales de 1,500-3,150msnm, se ha descrito en Chimaltenango, Guatemala, Jalapa, Sacatepéquez y Sololá (Cáceres, 2009).

e. Usos populares en dermatología

El aceite esencial se utiliza tanto para fines medicinales como cosméticos. El principal producto a base de aceite es el jabón. Conocido por su perfume único, nutre, suaviza, refresca y limpia la piel mientras actúa como un antiséptico. Es especialmente recomendado para pieles sensibles y dañadas, también se utiliza ampliamente en cosmética y productos hidratantes (Linares, Bye & Flores, 1990).

f. Actividad farmacológica y toxicológica

Estudios antifúngicos demuestran que la tintura de hojas tiene moderada actividad contra *C. albicans*; no así para enterobacterias (Cáceres, Cano, Samayoa & Aguilar, 1990). No se encuentran referencias sobre la toxicidad esta especie (Cáceres, 1996).

g. Composición química

El tamizaje fitoquímico indica en las hojas la presencia de alcaloides cuaternarios y no cuaternarios, saponinas, esteroides insaturados, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides, leucoantocianinas, quercitina, estilbina, taraxon y aceite esencial que contiene limoneno y citral (Ortiz & Brower, 1985).

6. *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger.

a. Nombre popular

Calahuala, calaguala (Honduras); polipodio, calaguala (Perú) (Ocampo, Martínez & Cáceres, 2007).

b. Sinonimia

Goniophlebium areolatum Kunth, *Phlebodium aureum* (L.) J. Sm., *Polypodium aureum* L., *Polypodium areolatum* Kunth, *P. leucotomos* Poir. (Ocampo, Martínez & Cáceres, 2007).

c. Descripción botánica

Helecho epifito con un rizoma hirsuto, escamoso, cuyas frondas se encuentran dispersas a lo largo de los rizomas; se presentan frondas fértiles (que presentan en el envés soros) y estériles (sin soros). Las frondas según su estado de desarrollo pueden medir hasta 120cm de largo desde la base del rizoma hasta la parte final de la lámina frondal. La fronda se divide en el estipe (pecíolo) y la lámina frondal que es pinnada. La fronda es imparipinada, una fronda adulta tiene de 25-29 pinnas. Un estipe de una fronda adulta llega a medir hasta 30cm de largo, es de color café rojizo con un diámetro en la base de 0.5cm. La lámina de la fronda mide de la base al ápice 45cm, las pinnas basales miden 26cm de longitud desde la aurícula (lóbulo basal de una pinna) hasta el ápice. En su parte más ancha la fronda mide 42cm (Cronquist, 1987). El largo de cada pinna es 32-33cm y el ancho de 4-5cm. El diámetro del pecíolo o ráquis de 0.7cm y de 10-40cm de largo. El número de soros en cada pinna es de 782, estos son de forma redonda ligeramente elongados, miden 0.5mm de diámetro y se disponen en una serie entre la costa y el margen; ocupando un área equivalente al 21.6% del área total de cada pinna. El tallo es

rizomatoso, protegido por una pelusa particular translúcido, las raíces son siempre laterales. Tallos, raíces y hojas están siempre provistas de un sistema vascular completo formado por haces leñosos y liberianos (Ocampo, Martínez & Cáceres, 2007).

Los rizomas son rastreros de 1-2cm de grosor recubiertos densamente por escamas. Las escamas son de forma linear-lanceoladas delgadas, de color naranja a ferruginosas y translúcidas de 0.5-1.5cm de largo, con márgenes cortamente ciliados. Los rizomas presentan meristemos (brotes) que se diferencian para formar frondes, la distancia entre meristemos sobre el rizoma es de 1.5-2cm (Cronquist, 1987).

d. Origen y distribución

Nativo de América. Se localiza en las zonas costeras del Atlántico, del sur de México hasta Sudamérica. Se encuentra con menos frecuencia en plantaciones de palma en Colombia y Ecuador. Su distribución también se extiende al Sureste de Estados Unidos y la Antillas (Morán, 1996; Ocampo, Martínez & Cáceres, 2007).

Crecen silvestres en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada y, en lugares de gran humedad a la sombra. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (Cáceres, 1996).

e. Usos populares en dermatología

Es una de las plantas empleadas como fuente de compuestos secundarios para la industria farmacéutica y cosmética, ya que dichos compuestos se utilizan en la preparación de pastillas para el tratamiento de vitiligo e inflamaciones (Barajas, et. al., 2007).

Del extracto acuoso del rizoma se obtiene una saponina llamada anapsos, que está compuesta por un cetosteroide y una desoxihexosa, que es utilizado para el tratamiento de dermatitis atópica, eccema, psoriasis y vitiligo. La infusión y decocción del rizoma también se usa tópicamente en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quemaduras, cáncer y cierto tipo de tumores (Barajas, et al., 2007; Martínez, Herrera, Castillo, Carrillo & Villatoro, 1990).

Por las mismas indicaciones puede aplicarse tópicamente, ya sea en forma de pomada o ungüento (Cáceres, 1996).

f. Actividad farmacológica y toxicológica

Se ha encontrado que tiene propiedades activas en tejido tumoral, por las saponinas (anapsos) que posee, las cuales reduce la incorporación de nucleoproteínas y precursores por un mecanismo anabolizante opuesto a la acción de citostáticos. Las calagualinas son saponinas aisladas del rizoma que tiene actividad antitumoral (Vargas, Munoz, Osorio & García, 1983).

Estudios de toxicidad realizados con ratones y ratas no han demostrado ninguna toxicidad a dosis aguda o crónica; en humanos, dosis orales mayores a 1000mg no ha mostrado toxicidad. La dosis terapéutica en humanos es de 1-4g/taza en decocción, 3-5mL de tintura 1:10

en etanol 35%. Valores de toxicidad aguda: CL_{50} 409.24mg/mL. DL_{50} en ratones es de 16369.6mg/kg. Los extractos acuosos y etanólicos del rizoma (500mg/kg) no han sido tóxicos para peces del género *Mollinesia*. En revisiones de literatura y bases de datos realizadas no se ha encontrado ninguna referencia sobre su toxicidad en humanos, mientras que la decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias (Barajas, et al., 2007; Cáceres, 1996; Morton, 1977).

g. Composición química

El rizoma contiene carbohidratos, aceite esencial, mucílago, almidón, nitrato de potasio y colorante rojo, además contiene calagualina, polipodina, aceites grasos y taninos, así como esteroides (ecdisterona y dos ecdisonas como la polipodaureina) (Morton, 1977; Roque, 1941).

La ecdisoma es secretado por el tejido ecdisial y luego es transformado en un compuesto más activo que es la 20-hidroxiecdisona, es inestable en solución alcalina. La adenosina es un nucleósido prácticamente insoluble en alcohol y en terapéutica es utilizado como antiarrítmico. Las especies usadas medicinalmente en El Salvador contienen alcaloides, sesquiterpenlactonas y taninos (Mena, 2009).

7. *Smilax domingensis* Willd

a. Nombre popular

Zarzaparrilla, bejuco de la vida, cocolmecha, china root, diente de chucho, palo de la vida (Standley & Steyermark, 1952).

b. Sinonimia

S. excelsa (Duhamel) Traité, *S. nigra* Willd, *S. variabilis* Pers, *S. sagittifolia* Lodd, *S. pendulina* Lowe (Standley & Steyermark, 1952).

c. Descripción botánica

Las plantas de esta especie son lisas completamente. Con tallos terrestres, escasamente armados en la parte inferior con aguijones robustos recurvados, inermes en la parte superior. Hojas de 6-15cm de largo, por 1.5-10cm de ancho, 1.4-6cm más largas que anchas, pueden ser ovadas, lanceolado-ovadas, o lanceoladas, cartáceas, inermes, son 5 nervios desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado o brevicuspidado, la base aguda, el margen entero; pecíolos 0.5 a 2cm de largo (Huff, 1994; Standley & Steyermark, 1952).

Las umbelas estamidas se encuentran solitarias; los pedúnculos pueden ser de 1-5mm, y más cortos que el pecíolo subyacente, terete o algo aplanado. Las umbelas pistiladas se encuentran solitarias; pedúnculos de 1-5mm, más corto que el pecíolo subyacente, subterete. Tépalos de las flores estaminadas de 4-6 mm; filamentos de 2-4mm; anteras de 1-2mm. Tépalos de las flores pistiladas de 4mm. Las bayas pueden ser de 7-10mm, de color rojo, púrpura o negro. Se pueden encontrar en bosques húmedos y espesuras (Huff, 1994; Standley & Steyermark, 1952).

d. Origen y distribución

Se distribuye en regiones tropicales y templadas. Hay algunas especies que son nativas de México, las cuales han sido cultivadas extensamente en la parte sur de éste país, también han sido propagadas en Guatemala, en departamentos como San Marcos, Santa Rosa, Sacatepequez, Suchitepequez, Alta Verapaz, Izabal y Peten (Standley & Steyermark, 1952).

e. Usos populares en dermatología

Es utilizada como depurativo especialmente en problemas dermatológicos como acné, eccemas, ictiosis y psoriasis (Cáceres, 1996)

f. Actividad farmacológica y toxicológica

La actividad antimicrobiana se atribuye a las saponinas, en particular a la sarsasapogenina y parillina con actividad antimicótica y antitumoral. La sarsasapogenina tiene actividad antiinflamatoria. La decocción de raíces de *S. lundellii*, *S. regelii* y *S. spinosa* tienen un DL₅₀ por vía oral en ratones mayor de 30g/kg (Cáceres, 2009).

La administración aguda (0.5-3.0g/kg.) del extracto de *S. regelii* no produce efectos tóxicos en ratones; la administración crónica (100mg/kg. durante 90 días) tampoco produjo síntomas de toxicidad ni cambios patológicos. Se observa que en dosis inusualmente grandes puede causar daño, aunque está aprobado su uso como alimento por el FDA. La DL₅₀ de la parillina cristalizada en ratones es de 10mg/kg administrada por vía intraperitoneal y 30mg/kg por vía oral (Cáceres, 2009).

g. Composición química

Contienen alcaloides, aceite esencial, esteroides insaturados, glicósidos esteroidales (saponinas, cardenólidos, bufadienólicos), flavonoides, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, resinas, azúcares y grasas; además agliconas esteroidales (parrillina, sarsapogenina, smilagenina), β -sitosterol, stigmasterol, ácido sarsápico, polinastanina y ácido paroapárico (Bérdy, Aszalo, Bostian & McNitt, 1982).

8. *Vernonia deppeana* Less.

a. Nombre popular

Suquinay, suquinay hembra, semém, sucunán, flor de cuaresma, rosa blanca, (Castelo, Ricalde & Panero, 2005).

b. Sinonimia

V. bangii Rusby, *V. lanceolaris* Kuntze, *V. micradenia* (DC.) Kuntze, *V. monsonensis* Hieron, *V. salamana* Gleason, *V. stellaris* Kuntze, *V. suaveolens* Kunth (Castelo, Ricalde & Panero, 2005).

c. Descripción botánica

Arbusto o árbol pequeño, algunas veces de 9m de alto, hojas alternas oblongas, tallo corto, 5-15cm de largo y de 2-7cm ancho, puntiagudas o romas, en los extremos, a veces ligeramente dentadas, ásperas con pelusa en la superficie superior, haz pubescente y envés blanco tomentoso. Sus flores son tubulares, blancas o rosadas de 18-21mm en forma de campana;

dispuestas en panículas ramificadas 10-30cm de largo. Las semillas son de 2.5mm de largo, con algunas vellosidades, con vilano café de 4-5mm de largo (Morton, 1977).

d. Origen y distribución

Se desarrolla en bosques de 300-2000msnm. Especie de hábito terrestre con variabilidad de humedad, crece en bosques de encino y pino-encino. Se encuentra en México, El Salvador y Costa Rica. En Guatemala crece en los departamentos de Chimaltenango, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepequez, San Marcos, Sololá, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Retalhuleu, Santa Rosa y Suchitepequez (Nash, 1974).

e. Usos populares en dermatología

Se ha empleado en casos de dermatitis, daño en la piel, irritación, infecciones del tracto urinario y pielonefritis (Cáceres, Girón, Alvarado & Torres, 1987).

f. Actividad farmacológica y toxicológica

En El Salvador, México y Guatemala, se ha utilizado esta planta por sus propiedades medicinales, ya que tiene diferentes propiedades tales como: antioxidante, antihemorrágico, antiinflamatorio, antialérgico y antibacteriano. El extracto etanólico presentó actividad contra *Gardnerella vaginalis* a una concentración de 1mg/mL (Nicolas, 1999; Samayoa, Palacios & Cáceres 2005).

g. Composición química

La planta consta de tres triterpenos (incluyendo amirina), flavonoides (incluyendo luteolina, quercetina) y esteroides (Nicolas, 1999).

H. Metodologías para la determinación de la actividad de tirosinasa

Los estudios similares realizados y citados acerca de la actividad vegetal inhibidora de la tirosinasa, describen los métodos utilizados para la determinación de dicha actividad los cuales se presentan a continuación.

1. Cualitativos

a. Western blot

Una de las técnicas más importantes en el análisis y caracterización de fracciones antigénicas es la Electroinmunotransferencia (Western Blot), que básicamente es un proceso cualitativo que combina la selectividad de la electroforesis en gel de poliacrilamida, que permite fraccionar al antígeno, con la sensibilidad de la prueba inmunoenzimática, que pone en evidencia los complejos antígeno-anticuerpo formados (Garfín, 1990).

Desde 1965 se evidenció la presencia de anticuerpos antimelanina que demostraron que eran del tipo IgG y activaban el complemento por la vía clásica. Para esto las técnicas utilizadas han sido diversas, con el Western Blot se ha podido detectar la presencia de anticuerpos contra antígenos de 116-113, 60 y 40 kDa de células SK-Mel-28 de melanoma humano en el suero de pacientes con vitíligo (Hann& Kim, 1995).

Estos anticuerpos, del tipo IgG no solo se dirigen contra los melanocitos, pero también se han detectado unidos a los queratinocitos en biopsias marcadas con inmunofluorescencia

indirecta y mediante ensayos inmunoenzimáticos (Soubiran, Benzaken, Bellet, Lacour & Ortonne, 1985).

Esta técnica se ha utilizado para la determinación de AIT a través de la evaluación de genes correspondientes a la expresión de proteínas relacionadas a la pigmentación. Se realiza cultivando melanocitos en un medio que contenga las sustancias presuntivas de poseer actividad inhibitoria de proteínas relacionadas a la síntesis de tirosinasa a diferentes concentraciones por 24 horas, luego las células son lisadas y se somete a la técnica de Western blot con anticuerpos contra la enzimatirosinasa, esto permite observar si hay inhibición de síntesis de tirosinasa (Lin, Hu, Chen, Chern, & Lee, 2007).

b. Cromatografía en Capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina es un caso de cromatografía de reparto en la que los componentes de una mezcla se separan por diferencia de solubilidad entre dos sistemas disolventes. Los elementos del sistema cromatográfico son: soporte, fase estacionaria (disolvente A), y fase móvil o eluyente (disolvente B). Es una técnica simple en cuanto al equipamiento necesario (placa y tanque cromatográfico) y de fácil desarrollo. El parámetro experimental asociado a la técnica es el R_f (coeficiente de reparto), relacionado con la solubilidad relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y fase móvil, y que depende de su estructura química y su hidrosolubilidad/liposolubilidad (Smith & Feinberg, 1965).

En la CCF, se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo “manchas” de los componentes, de

acuerdo con sus solubilidades relativas (coeficientes de reparto). Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante diversas sustancias reveladoras. Así pues, con la adaptación de esta metodología, se han realizado proyectos en los que se han determinado la actividad antitirosinasa de diferentes extractos de productos naturales, de los cuales se han evaluado sus componentes activos cuya separación ha permitido la investigación de sus efectos inhibitorios de la melanogénesis en el proceso de un melanoma (Hammond, 1999).

La CCF presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos, ya que los materiales y equipo que precisa son más simples, el tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es menor y la separación es generalmente mejor, pues se obtiene mayor resolución. Además se puede utilizar un gran número de materiales como soportes y disolventes y los resultados son fácilmente reproducibles. Con la adaptación de esta metodología, se han realizado proyectos en los que se han determinado la actividad antitirosinasa de diferentes extractos de productos naturales por medio de la separación de los metabolitos vegetales en una placa cromatográfica que luego es rociada con la tirosina (sustrato) y posteriormente con la tirosinasa, la AIT se interpreta como positiva cuando se presentan áreas blancas en un fondo morado grisáceo (Momtaz, et al., 2008; Smith & Feinberg, 1965).

Esta metodología permite identificar componentes activos cuya separación ha permitido la investigación de sus efectos inhibitorios de la melanogénesis en el proceso de un melanoma, razones por las que en la realización del presente estudio, hace que sea un método adecuado para nuestros fines analíticos y la metodología elegida para demostrar de forma cualitativa la actividad

inhibitoria de la tirosinasa de los extractos vegetales estudiados (Momtaz, et al., 2008; Smith & Feinberg, 1965).

2. Cuantitativos

a. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica de Biología Molecular que permite la síntesis “*in vitro*” de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN). La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en sentido 5` a 3` usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena, se utilizan los denominados iniciadores (primers). Estos son una pareja de oligonucleótidos diseñados de tal manera que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Este proceso se lleva a cabo mediante ciclos alternados de temperaturas altas y bajas, que permiten separar las hebras de ADN formadas entre si tras cada fase de replicación y, la unión nuevamente de estas hebras con la polimerasa para que vuelvan a duplicarse (Bartlett, & Stirling, 2003).

La PCR tiempo real es una reacción de PRC cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original (Bartlett & Stirling, 2003). Se ha utilizado la técnica de PCR en tiempo real para observar la relación entre los melanomas y la actividad de la tirosinasa. En este caso diversos estudios han demostrado que la actividad de la enzima tirosinasa, a partir de la amplificación de genes que codifican para esta enzima, el producto proteico de estos genes es una enzima que participa directamente en el proceso de

melanogénesis. Se sabe que la tirosinasa se expresa en los estadios avanzados de la enfermedad y se la ha detectado incluso en pacientes con melanoma amelanótico (Kaufmann, Koch, Burghardt, Audring & Dietel, 1998)

La técnica de RT-PCR fue utilizada por Momtaz, et. al (2008) para determinar AIT debido a que es considerado beneficioso determinar si la inhibición de la actividad de la tirosinasa estaba relacionada con la inhibición de su actividad a un nivel transcriptacional. Por lo tanto, el grado de expresión de mRNA para este gen fue determinado semi-cuantitativamente por PCR-RT utilizando células de ratón (melanocitos) tratadas con extracto de corteza de *sideroxyloninerve*. El ARN total fue extraído de las células cultivadas utilizando el Kit Mini Panta RNeasy (Qiage, EU). La calidad de la muestra total de ARN fue evaluada por la determinación del radio A260/A280. Para preparar un pool de cDNA de cada muestra de ARN de ARN total (1µg) fue transcrita en reversa utilizando el Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, EU). Cada pool de cDNA fue almacenado a -20 °C hasta que se llevó a cabo el análisis PCR-RT (Momtaz, et al., 2008).

Pares de cebadores específicos de oligonucleótidos a utilizar para la PCR-RT fueron adquiridos de Industrias Inqaba Biotechnical (Sudáfrica). Como control interno, fue amplificado también células GAPDH mRNA de ratón utilizando amplimers de ratón GAPDH. Las secuencias de los cebadores utilizados para la transcripción reversa de la PCR-RT) fueron las siguientes: Cebadores hacia delante de la tirosinasa: 5'CGAGCCTGTGCCTCCTCTAA3'. Cebadores en reversa de la tirosinasa: 5'CCAGGACTCACGGTCATCCA3'. Cebadores hacia delante de GAPDH: 5'CCAATGTGTCCGTCGTGGAT3' y el cebadores en reversa de GAPDH: 5'GCTGTTGAAGTCGCAGGAGA3' (Momtaz, et al., 2008).

Dos microgramos tratados en total de DNaseI y una columna purificada de extracto de ARN de células de ratón tratadas con extracto metanólico *Sideroxylon inerme* (25 µg/mg), células control sin tratar de ratón fueron transcritas en reversa a la cebadora cadena cDNA utilizando Transcriptasa ImpromII Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Cada PCR contenía los siguientes componentes: 1 µL de cDNA, amortiguador de fosfato, MgCl₂ 2.5mM, dNTPs 0.2mM, 0.2µM de cada cebadores y 1 unidad de Taq polimerasa. Amplificadores de ADN fueron realizados utilizando Gene Amp PCR system 2400 (PerkinElmer, California, USA). Las condiciones del ciclo fueron de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 6 minutos. Los productos fueron removidos luego de 23, 25, 28, 30 y 32 ciclos y se corrieron en un gel de agarosa de 2% (m/v) al lado de un estándar. El gel fue fotografiado bajo luz UV y la cantidad de ADN representado en cada banda de ADN fue calculado utilizando el VersaDoc™ 4000 (Bio-Rad Laboratories, Inc. Life Science Research Group, California, USA). Los datos fueron introducidos en Microsoft Excel y la expresión de tirosinasa fue estandarizado a la expresión de gen de control interno, GAPDH. Los resultados fueron mostrados en una gráfica de barras representando el porcentaje de inhibición de la expresión de tirosinasa en los diferentes tratamientos comparados a la muestra control no tratada (Momtaz, et al., 2008).

c. Espectrofotometría

Es uno de los métodos más sencillos, accesible, útil y utilizado, en particular. Se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras biológicas, con el empleo de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar y forman un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas (Díaz, et. al., 2010).

El fundamento de la espectrofotometría se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas (Díaz, et al., 2010).

Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, E_1 , a un estado de mayor energía (estado excitado), E_2 . Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula, esto es, su espectro de absorción constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental (Díaz, et al., 2010).

Para la determinación cuantitativa de la AIT a través de esta técnica se debe preparar una solución de extractos con 20 mg en 1 mL de DMSO. (Solución Madre). Luego la solución madre se diluye en 200 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de amortiguador de fosfato 50 mM (pH 6.5). A 70 μL de la dilución se añaden 30 μL de solución de tirosinasa de 333 unidades. Se incuba a temperatura ambiente por 5 min para luego agregar 110 μL de sustrato e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se debe leer la absorbancia a 490 nm. El blanco reactivo se prepara con 70 μL de la solución madre y 30 μL de solución de tirosinasa de 333 unidades. Para calcular el porcentaje de inhibición de la enzima se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = [B-S/B] \times 100$$

Siendo B y S las absorbancias del blanco y las muestras respectivamente (Momtaz, et al., 2008).

La mayor parte de los métodos cinéticos se apoyan en la espectrofotometría como técnica para supervisar una reacción, tiene ventajas sobre otras metodologías como: sensibilidad relativa elevada, facilidad para realizar mediciones rápidas y un grado de especificidad relativamente elevado siendo una herramienta importante que ha permitido monitorear la reacción entre la tirosinasa y la L-tirosina, en presencia de algún compuesto de origen natural inhibidor de la actividad de la tirosinasa; pudiendo calcular el porcentaje de inhibición de la enzima a partir de la absorbancia del producto formado. Por eso, en este estudio se ha elegido como metodología cuantitativa para determinar el porcentaje de actividad inhibitoria de tirosinasa de los extractos vegetales que presenten esta actividad en la metodología cualitativa (Azhar-ul-Haq, et al., 2006; Lee, et al. 1997; Mohd, et al., 2008; Momtaz, et al., 2008).

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es un país que cuenta con una diversidad muy amplia de recursos naturales que utilizados adecuadamente podrían contribuir al desarrollo sostenible del país. Entre esos recursos se encuentran diferentes plantas, algunas de las cuales se utilizan en la medicina popular para tratar enfermedades de diferente tipo e incluso problemas asociados a cosmética, como el que representa las manchas cutáneas por hiperpigmentación, el cual pone de manifiesto el interés dermatológico y farmacéutico de los productos despigmentantes. Por ello, es fundamental realizar una caracterización general de la potencialidad antitirosinasa de plantas nativas de Mesoamérica, que permitan dar una solución práctica a la problemática de la hiperpigmentación cutánea a través de la inhibición de la actividad de la enzima tirosinasa que participa activamente en el proceso de la pigmentación de la piel.

Es importante desarrollar una metodología práctica y efectiva con la cual se pueda lograr la medición de la actividad antitirosinasa en extractos de plantas nativas del país y que permita iniciar nuevos procesos en el desarrollo del tratamiento de la hiperpigmentación dérmica y con esto evaluar de mejor manera los usos potenciales de las propiedades de las plantas incluidas en este estudio, lo que permitirá elaborar recomendaciones sobre qué plantas y cuáles procedencias podrían cultivarse y utilizarse para el abastecimiento de la industria farmacéutica y cosmética.

V. OBJETIVOS

A. General

1. Evaluar la actividad antitirosinasa en ocho plantas nativas de Mesoamérica.

B. Específicos

1. Establecer una metodología cualitativa y cuantitativa, para la medición de la actividad antitirosinasa de los extractos vegetales.
2. Evaluar los extractos, diclorometánicos y metanólicos, para determinar la actividad antitirosinasa de los extractos vegetales cualitativamente.
3. Determinar cuantitativamente la actividad antitirosinasa de los extractos vegetales.

VI. HIPÓTESIS

1. Por lo menos uno de los extractos de las ocho plantas nativas de Mesoamérica posee acción antitirosinasa.
2. El extracto metanólico posee una mayor acción antitirosinasa en comparación al extracto diclorometánico.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

1. Universo y muestra

a. Universo

Plantas nativas de la región de Mesoamérica usadas en aplicación dérmica.

b. Muestra

Ocho extractos diclorometánicos y ocho metanólicos de la raíz de *Dorstenia contrajerva*, corteza de *Byrsonima crassifolia*, hojas de *Gliricidia sepium*, *Lippia graveolans*, *Litsea guatemalensis* y *Vernonia deppeana*; rizoma de *Smilax domingensis* y *Phlebodium pseudoaureum*. Todas estas plantas son nativas de Guatemala, que fueron escogidas con base a sus aplicaciones dermatológicas y a la inexistencia de estudios previos en el país sobre su actividad antitirosinasa.

2. Recursos

a. Humanos

- Profa. Amanda Margarita Agustín Gómez Seminarista
- Br. Axel Ernesto Martínez Castellanos Seminarista
- Br. Moramay de los Ángeles Calderón Arias Seminarista
- Br. Jeremy Omar Ortiz Juárez Seminarista
- Lic. Armando Cáceres Asesor

- Licda. Ana Margarita Paz

Revisora

b. Institucionales

Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

3. Materiales y reactivos

a. Generales

- Ácido kójico Sigma-Aldrich Química y estándar de 1,2-benzopirona (Cumarina) No. 202-086-7 Sigma
- Agua desmineralizada
- Balanza semianalítica y analítica
- Beakers de vidrio de 100-250 mL
- Cronómetro
- Erlenmeyer de 50-500 mL
- Espátulas
- Gradilla
- Papel aluminio
- Papel encerado
- Papel parafilm
- Pipeta automática de volumen variable 100 a 1,000 μ L
- Pipeta automática de volumen variable 20 a 200 μ L

- Plantas secas y/o extracto de ocho plantas nativas de Mesoamérica
- Refrigeradora
- Tips amarillos y azules
- Tirosina de hongo Sigma-Aldrich Química.
- Tirosinasa de hongo (333 U/mL) Sigma-Aldrich Química.
- Tubos de ensayo
- Vórtex

b. Extractos vegetales

- Agitador de vidrio
- Balón de fondo redondo de 1000 mL
- Crisol
- Desecadora
- Diclorometano al 100%
- Equipo de enfriamiento tipo chiller
- Frascos pequeños color ámbar
- Metanol absoluto
- Mortero
- Papel filtro
- Percolador
- Pinzas con nuez
- Plantas secadas al horno a 40 °C
- Recipientes de plástico

- Rotavapor
- Silicón
- Soporte universal

c. Cromatografía en capa fina (CCF)

- Acetona al 99%
- Ácido kójico Sigma-Aldrich Química y estándar de 1,2-benzopirona (Cumarina) No. 202-086-7 Sigma (controles positivos)
- Amortiguador de fosfato de sal potásica 50 mM (pH=6.5)
- Asperjador
- Balón aforado de 250 mL
- Cámara de cromatografía
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Incubadora
- Lámpara de luz ultravioleta
- Metanol absoluto
- Placas para cromatografía fina de sílica gel 60F254
- Probeta de 25 mL
- Tubos capilares sin heparina

d. Espectrofotometría

- Ácido kójico Sigma-Aldrich Química
- Agitador de ELISA

- Amortiguador de fosfato de sal potásica 50 mM (pH = 6.5)
- Balón aforado de 10 mL
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Espectrofotómetro con capacidad de rango de 400a 500 nm
- Incubadora
- Microplacas de titulación de 96 pocillos de fondo plano
- Pipetas Pasteur

B. Metodología

1. Obtención de extractos

Se buscó en la colección de extractos del Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología y del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), extractos de plantas que fueran a evaluarse en el estudio. Los extractos faltantes, se realizaron mediante percolación fraccionada a partir de plantas secadas al horno, seguido de concentración por rotavaporador; para lo cual se emplearon las partes de las plantas que tienen mayor cantidad de compuestos y que se utilizan comúnmente para ensayos similares. Como disolventes se emplearon diclorometano y metanol.

a. Procedimiento

- Se pesaron 400 g de material vegetal.
- Se humedeció la cantidad de material vegetal con el solvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.

- Se transfirió todo el material al percolador y se agregó solvente hasta cubrir el material vegetal.
- Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, lo cual depende del material vegetal, el disolvente y la temperatura de trabajo (aproximadamente de 24-48 horas)
- Posteriormente se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear la solución a una velocidad adecuada, hasta dejar que salga toda la solución.
- Se recolectó la solución en un erlenmeyer y se colocó en un balón, el cual se instaló en el rotavapor, engrasando todas las partes esmeriladas con silicón.
- Se procesó la solución obtenida a una temperatura de 45 °C y en el caso del metanol, se conectó la bomba de vacío para ejercer una presión de aproximadamente 400 mmHg.
- El disolvente destilado (recuperado) se añadió al percolado preparado anteriormente, añadiendo suficiente solvente extra, si era necesario, hasta completar un volumen de solvente igual al utilizado inicialmente.
- Se repitió el procedimiento las veces necesarias hasta obtener un extracto.
- Se trasvasaron los extractos que quedaron en el balón a crisoles previamente tarados y se guardaron en desecadora hasta llegar a sequedad (aproximadamente 1 mes).
- Posteriormente se pesaron los extractos obtenidos y se calculó el porcentaje de rendimiento.
- Se trasvasaron los extractos a frascos pequeños color ámbar, debidamente rotulados para su almacenamiento en la refrigeradora (Momtaz, et al. 2008).

2. Actividad antitirosinasa: Ensayo bioautográfico

a. Principio

Ensayo de cromatografía en capa fina, donde la actividad antitirosinasa depende de la afinidad del extracto, el cual tiene un efecto quelante por el Cu^{2+} (ión que participa en la reacción entre sustrato-enzima), impidiendo que catalice la reacción, mostrándose así, las zonas incolores que indican actividad antitirosinasa en un fondo gris púrpura, utilizando L-tirosinasa como revelador, método por el cual se han determinado límites mínimos detectables de 0.7 μg para ácido kójico (Curto et al. 1999; Momtaz, et al. 2008).

b. Procedimiento

i. Preparación de reactivos

- Se disolvieron 6.085 g de KH_2PO_4 al 0.02 M con un poco de agua desmineralizada y se aforó a 1,000 mL
- Se tomaron 142.5 mL de esta solución y agregar 11.6 mL de NaOH al 0.1 M y se aforó a 250 mL con agua desmineralizada.
- Se verificó que el pH de la solución final fuera de 6.5
- Se pesaron 2 y 0.2 mg de L-tirosinasa (Solución de 3,333 y 333 unidades U/mL, respectivamente)
- Se disolvió la L-tirosina en 10 mL de amortiguador de fosfato.
- Se pesaron 3.6 mg de L-tirosina
- La L-tirosina se disolvió en 10 mL de amortiguador de fosfato (concentración 2 mM).

- Se prepararon dos soluciones de cada extracto metanólico y/o diclorometánico, diluyendo 20 y 2 mg de extracto en 1 mL de acetona. En el caso de los extractos metanólicos que no se disolvieron completamente, se realizó una dilución 1:20, utilizando DMSO (DMSO:acetona), para disolver totalmente el extracto.
- Se disolvieron 2 mg de ácido kójico y de 1,2-benzopirona en 10 mL de agua desmineralizada (Momtaz, et al. 2008).

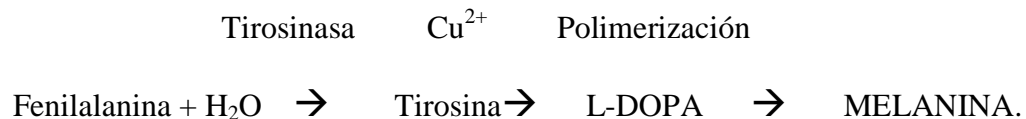
ii. Evaluación de actividad antitirosinasa

- Se depositaron 10 μ L de cada solución de extracto y 5 μ L de los controles positivos (ácido kójico y 1,2-benzopirona) en la placa de sílica gel (fase estacionaria) y se dejó secar.
- Se colocó la placa dentro de la cámara cromatográfica que contenía la fase móvil compuesta por acetona/metanol 1:49 y se dejó eluir.
- Se removió la placa de sílica gel de la fase móvil.
- La placa se asperjó con solución de tirosina y se incubó por 10min. a temperatura ambiente.
- Se asperjó la placa con solución de tirosinasa de 3,333 unidades y se incubó por otros 30min. a temperatura ambiente.
- Se observó la inhibición de tirosinasa con la aparición de zonas incoloras en un fondo gris-violeta, lo que reveló la presencia de compuestos activos en los extractos (Momtaz, et al. 2008).

3. Actividad antitirosinasa: Ensayo espectrofotométrico

a. Principio

Prueba colorimétrica, enzimática, homogénea, donde la actividad antitirosinasa es inversamente proporcional a la concentración de dopaquinona (Momtaz, et al. 2008). La actividad es medida por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. La fenilalanina es hidroxilada por medio de la enzima fenilalanina hidroxilasa o tirosinasa para la formación de tirosina. Esta se oxida con Cu^{2+} produciendo catecolaminas, especialmente la L-DOPA siendo ésta la precursora de la melanina y la que puede ser medida a la longitud de onda mencionada por su coloración amarilla.



b. Procedimiento

i. Preparación de reactivos

- El amortiguador se prepara en forma similar al ensayo bioautográfico.
- Por cada 1mL se utilizaron 0.20 mg de L-tirosinasa y, se prepararon 5 mL de enzima, por lo que se pesó 1mg de L-tirosinasa. (de 333 unidades)
- Se diluyó en 5 mL de amortiguador de fosfato.
- El sustrato se prepara en forma similar al ensayo bioautográfico.
- Se pesaron 20 mg de ácido kójico y se disolvió en 1 mL de amortiguador de fosfato, obteniendo una concentración de 20 mg/mL (solución madre).

- Se preparó una solución madre de cada extracto metanólico y/o diclorometánico, diluyendo 20 mg de extracto en 1 mL de DMSO (concentración 20 mg/mL).
- A partir de la solución madre de los extractos y del control, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 2.0; 1.0; 0.5 y 0.250 mg/mL, utilizando amortiguador de fosfato 5mM (pH 6.5) como diluyente (Momtaz, et al. 2008).

ii. Evaluación de actividad antitirosinasa

- En placas de microtitulación de 96 pocillos, se colocaron 70 μ L de cada dilución de los extractos y del control positivo (solamente se utilizó ácido kójico).
- Posteriormente se añadió 30 μ L de solución de tirosinasa de 333 unidades.
- Como blanco reactivo se utilizaron 70 μ L de buffer de fosfato y 30 μ L de solución de tirosinasa de 333 unidades.
- Se incubó a 37 °C con agitación constante durante 60 min.
- Pasado el tiempo se añadieron 110 μ L de sustrato y se incubó durante otros 15 min. a incubó a 37 °C con agitación constante.
- Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.
- Se calculó el porcentaje de inhibición de la enzima y el CI_{50} (Momtaz, et al. 2008).

C. Diseño de la investigación

1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio de diseño experimental no aleatorio.

2. Variables

a. Independientes

Los dieciséis extractos (ocho diclorometánicos y ocho metanólicos) de *D. contrajerva*, *B. crassifolia*, *G. sepium*, *L. graveolans*, *L. guatemalensis*, *P. pseudoaureum*, *S. domingensis*, *V. deppean*.

b. Dependientes

Determinación de la presencia de actividad antitirosinasa mediante ensayos cualitativos y cuantitativos.

i. Método cualitativo

Se realizó un estudio experimental mediante cromatografía en capa fina en donde se realizaron cuatro réplicas de cada extracto tanto metanólicos como diclorometánicos en dos concentraciones diferentes (20 y 2 mg/mL), incluyendo ácido kójico y 1,2-benzopirona como controles positivos con actividad antitirosinasa. La actividad antitirosinasa se evidenció por la presencia de zonas incoloras. Primero, se trabajaron con 200 μ g (20 mg/mL) de cada extracto como un tamizaje de las plantas que presentaran actividad antitirosinasa. Debido a que ésta es una concentración muy alta para ser utilizada dermatológicamente, se procedió a realizar una solución con concentración de 2 mg/mL para evaluar 20 μ g de los extractos que fueran positivos.

ii. Método cuantitativo

El ensayo cuantitativo se realizó por medio de espectrofotometría. Se realizaron diluciones del ácido kójico (único control positivo utilizado para esta prueba), con las cuales se

estableció la ecuación de la recta y una curva patrón. A partir de los valores obtenidos, se calculó el porcentaje de inhibición de tirosinasa. Luego se estableció la actividad antitirosinasa en términos de concentración de inhibición del 50% (CI_{50}), que es la concentración mínima del ácido kójico requerida para dar un 50% de inhibición de la actividad de tirosinasa. El valor determinado de la CI_{50} de ácido kójico sirvió como base para comparar la actividad de los extractos. En el ensayo cualitativo se observó que todos los extractos vegetales, tanto metanólicos como diclorometánicos, presentaron pequeñas zonas incoloras, de R_f similar, al utilizar la concentración de 2 mg/mL. Para cuantificar y evaluar la capacidad de los extractos de inhibir la tirosinasa, se realizó un tamizaje por espectrofotometría a partir de dicha concentración y posteriormente se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 1.0; 0.5 y 0.250 mg/mL; solamente de los extractos que presentaron un porcentaje de actividad antitirosinasa alrededor del 50%.

3. Estandarización de métodos

Tanto para el ensayo cualitativo como cuantitativo, se utilizó como control positivo ácido kójico, el cual por sus características posee una buena actividad antitirosinasa. Para la prueba cualitativa se utilizó también 1,2-benzopirona, como un segundo control positivo. Se utilizaron compuestos de casas comerciales de L-tirosina y L-tirosinasa para poner de manifiesto la actividad inhibitoria de los extractos evaluados y de los controles positivos, en placas de sílica gel. Para el ensayo cuantitativo, se realizó una curva estándar para establecer la CI_{50} del ácido kójico que se utilizó como referencia para comparar la efectividad de los extractos en estudio.

4. Análisis estadístico

a. Ensayo cualitativo

Se realizó la metodología de cromatografía en capa fina, llevando a cabo cuatro réplicas de cada extracto tanto, diclorometánicos como metanólicos, a dos concentraciones diferentes: 20 y 2 mg/mL (para un nivel de significancia $\alpha=0.1$), incluyendo ácido kójico y 1,2-benzopirona como controles con actividad antitirosinasa (controles positivos).

El análisis estadístico se llevó a cabo por una prueba de hipótesis binomial, estableciendo una hipótesis nula (H_0) que dice que el extracto no tiene actividad antitirosinasa, representada por un valor de $p=0.5$, y una hipótesis alterna (H_a) que señala que el extracto sí tiene actividad antitirosinasa, representada por un valor de $p>0.5$. Se requirió que las cuatro réplicas fueran positivas para rechazar H_0 .

b. Ensayo cuantitativo

Se utilizó únicamente ácido kójico como control positivo, del cual se realizaron varias diluciones, obteniendo concentraciones de: 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g/mL}$, haciendo por quintuplicado la prueba en cada una de las tres réplicas realizadas (tres diferentes placas de reacción).

Se obtuvo un promedio de los valores resultantes para cada concentración, con los cuales se realizó una regresión lineal para obtener curvas de calibración, y con esto se determinó la ecuación de la recta y una curva patrón global, obteniendo un valor de r^2 entre 0.95-0.99. La curva patrón se evaluó con un valor de significancia del modelo de 0.05 para determinar la

correlación lineal significativa de la prueba. A partir de los valores obtenidos de la curva patrón, se calculó el porcentaje de inhibición de tirosinasa, para cada concentración:

$$\% \text{ de inhibición} = [B-S/B] \times 100$$

Donde B es la absorbancia del blanco y S es la absorbancia del ácido kójico o muestras. Luego de graficar la concentración del extracto en el eje X vs. porcentaje de inhibición en el eje Y, se estableció la actividad antitirosinasa en términos de concentración de inhibición del 50% (CI₅₀). Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la fórmula de la siguiente manera:

$$CI_{50} = [50 - \text{pendiente}] / \text{intercepto}$$

El valor determinado de CI₅₀ de ácido kójico sirvió como base para evaluar la efectividad de los extractos en estudio, cuyos porcentajes de actividad antitirosinasa fueron obtenidos a partir de una serie de diluciones de cada uno (ya sean metanólicos como diclorometánicos) hasta encontrar el CI₅₀.

La prueba se realizó por quintuplicado por cada una de las tres réplicas realizadas. Los datos obtenidos de los extractos fueron comparados con los datos del ácido kójico y se esperaba que con una concentración similar a la CI₅₀ del ácido kójico, los extractos tuvieran la capacidad de inhibir el 50% de la actividad de la tirosinasa.

VIII. RESULTADOS

A. Colecta y obtención de extractos

Los extractos metanólicos y diclorometánicos de *D. contrajerva*, *L. graveolens*, *L. guatemalensis*, *P. pseudoaureum* y *V. deppeana* fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica y por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Los extractos de *B. crassifolia*, *G. sepium* y *S. domingensis* se obtuvieron por la técnica de percolación fraccionada de la planta seca (Fotografía 1-3, anexos). La planta que presentó un mayor rendimiento fue *G. sepium*, cuyos porcentajes metanólico y diclorometánico fueron de 29.01% y 27.05%, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Información general de las plantas utilizadas y porcentaje de rendimiento.

Nombre científico/Autor	Nombre común	Parte utilizada	No. de Herbario	Lugar de colecta	Georeferencia	Rendimiento (%)	
						Metanol	Diclorometano
<i>Dorstenia contrajerva</i> L.	Contrahierba	Raíz	1082	Ecoparcela el Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez.	14°33'06.09" N 91° 27'58.7" O	10.17	1.50
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth.	Nance	Corteza	31	Samayac, Suchitepéquez	14° 33'10.9" N 91°27'56.8" O	27.50	11.45
<i>Gliricidia sepium</i> Jacq	Madrecacao	Hojas	233	Samayac, Suchitepequez	14° 33'49" N 91°27'38" O	29.01	27.05
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Orégano	Hojas	604	Ecoparcela el Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14° 33'06.1" N 91°28'01.02" O	9.70	6.91
<i>Litsea guatemalensis</i> Mez.	Laurel	Hojas	965	Tecpán, Chimaltenango	14°33'952'' N 90°40'752'' O	8.92	9.45
<i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Cav.) Lellinger.	Calahuala	Rizoma	1176	Biocultivos de Guatemala S.A, San José Pinula	14° 34'23.1" N 90°20'21" O	7.22	1.97
<i>Smilax domingensis</i> Willd	Zarzaparrilla	Rizoma	662	Aldea Cerro Gordo, Santa Rosa	14° 25' 50" N 90°18'44" O	21.40	3.78
<i>Vernonia deppeana</i> Less.	Suquinay	Hojas	1122	Ecoparcela el Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14° 33'06.7" N 91° 28'04.0" O	4.90	5.30

Fuente: Laboratorio de Productos Naturales Farmaya, S. A. y Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

B. Estandarización de los métodos

1. Método cualitativo

En la validación del método cualitativo por cromatografía en capa fina los controles positivos, el ácido kójico y la 1,2-benzopirona, presentaron zonas incoloras en un fondo gris púrpura, cuyos factores de retención (Rf) fueron de 0.84 ± 1 para la 1,2 benzopirona y de 0.28 ± 2 para el ácido kójico. Los resultados se analizaron por cuadruplicado con un nivel de significancia $\alpha=0.1$ utilizando 10 μL a una concentración de 2 mg/mL (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad antitirosinasa de los controles positivos (2 mg/mL)

Control positivo	Rf	Color	Resultado
1, 2 benzopirona	0.84 ± 1	Incoloro	Positivo
Ácido kójico	0.28 ± 2	Incoloro	Positivo

Rf: Factor de retención. Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIPRONAT, USAC.

2. Método cuantitativo

Se obtuvieron curvas dosis-efecto de la actividad antitirosinasa del ácido kójico, con un coeficiente de determinación (r^2) entre 0.981-0.984. Con los datos de las tres curvas se obtuvo una curva patrón cuyo r^2 fue de 0.991 y un porcentaje de coeficiente de variación $<5\%$ entre repeticiones y corridas, observando precisión en la metodología (Cuadro 3).

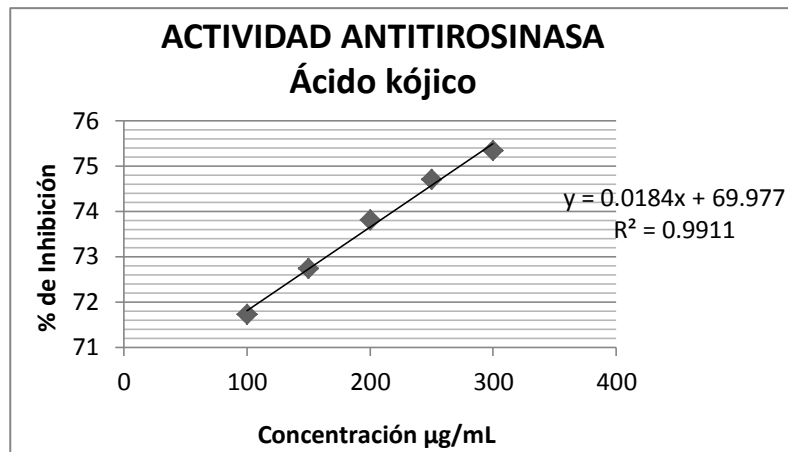
Cuadro 3. Parámetros de regresión lineal.

No. de corrida	DS	% CV	r	r^2
1	0.0044	1.7388	0.990	0.981
2	0.0058	2.4729	0.992	0.984
3	0.0195	4.0564	0.991	0.983
Curva patrón	0.0098	3.9590	0.995	0.991

DS: Desviación estándar. %CV: Porcentaje de coeficiente de variación r: Coeficiente de correlación. r^2 : Coeficiente de determinación. Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Cihohistología, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, USAC.

Con los datos y los resultados de la curva patrón, se calculó y graficó el porcentaje de inhibición correspondiente a cada concentración (Gráfica 1).

Gráfica 1. Porcentaje de inhibición del ácido kójico.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Cihohistología, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, USAC.

C. Determinación de actividad antitiroSinasa en extractos vegetales

1. Método cualitativo

En los ensayos en cromatografía en capa fina, tanto para los extractos diclorometánicos como metanólicos, no se obtuvo una buena separación de los metabolitos presentes en los extractos, por lo que se observó un R_f similar entre éstos, que va de 0.74-0.88. A pesar de la ausencia de color en las zonas finales de la cromatoplaca, estos resultados no son conclusivos para la actividad antitiroSinasa (Cuadro 4).

Cuadro 4. Actividad antitirosinasa de extractos diclorometánicos y metanólicos (2 mg/mL)

Planta	Extractos diclorometánicos		Extractos metanólicos	
	Rf	Color	Rf	Color
<i>Dorstenia contrajerva</i>	0.88±1	Incoloro	0.74±2	Incoloro
<i>Byrsonima crassifolia</i>	0.83±3	Incoloro	0.74±2	Incoloro
<i>Gliricidia sepium</i>	0.86±1	Incoloro	0.77±1	Incoloro
<i>Lippia graveolens</i>	0.83±2	Incoloro	0.78±3	Incoloro
<i>Litsea guatemalensis</i>	0.87±1	Incoloro	0.77±1	Incoloro
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	0.87±3	Incoloro	0.80±3	Incoloro
<i>Smilax domingensis</i>	0.84±2	Incoloro	0.83±2	Incoloro
<i>Vernonia deppeana</i>	0.86±2	Incoloro	0.83±2	Incoloro
1, 2 benzopirona *	0.84±3	Incoloro	0.85±1	Incoloro
Ácido kójico *	0.28±1	Incoloro	0.26±1	Incoloro

*Control positivo. Rf: Factor de retención. Fuente: Datos experimentales obtenidos en el LIPRONAT, USAC.

2. Método cuantitativo

En la evaluación inicial de los extractos a una concentración de 2 mg/mL, se evidenció que la mayoría de extractos no posee la capacidad de inhibir el 50% de la actividad enzimática, sin embargo los dos extractos, diclorometánico y metanólico, de *D. contrajerva* y los extractos metanólicos de *B. crassifolia*, *G. sepium* y *P. pseudoaureum* poseen una actividad inhibitoria $\geq 50\%$ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad antitirosinasa de los extractos a una concentración de 2 mg/mL.

Planta	% de inhibición	
	Extractos diclorometánicos	Extractos metanólicos
<i>Dorstenia contrajerva</i>	52.1 ± 1.8	62.1 ± 3.3
<i>Byrsonima crassifolia</i>	31.9 ± 3.1	61.9 ± 3.2
<i>Gliricidia sepium</i>	20.4 ± 2.6	64.5 ± 3.5
<i>Lippia graveolens</i>	22.2 ± 3.1	4.2 ± 3.2
<i>Litsea guatemalensis</i>	10.5 ± 3.8	17.4 ± 8.7
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	17.4 ± 3.4	61.2 ± 4.5
<i>Smilax domingensis</i>	17.9 ± 4.7	14.8 ± 2.7
<i>Vernonia deppeana</i>	20.7 ± 3.9	26.8 ± 3.3
Ácido kójico	71.3 ± 1.3	72.2 ± 1.4

Datos experimentales obtenidos en el departamento de Cihohistología, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, USAC.

A los extractos que tuvieron una actividad $\geq 50\%$ se les realizó una serie de diluciones, a fin de determinar su CI_{50} , donde se obtuvo que el extracto diclorometánico de *D. contrajerva* posee CI_{50} de 2 mg/mL; y que los extractos metanólicos de *D. contrajerva* y *B. crassifolia*, entre 1 y 2 mg/mL. Los resultados del ensayo cuantitativo no reflejan una actividad antitirosinasa significativa (CI_{50}) en ninguno de los extractos del estudio, la cual se estima de ≤ 1 mg/mL (Cuadro 6).

Cuadro 6. Inhibición de tirosinasa de los extractos vegetales (CI_{50}).

Plantas	Extractos	Concentraciones / % de inhibición			CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
		2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL	
<i>D. contrajerva</i>	Diclorometánico	50.6 \pm 2.9	29.0 \pm 4.4	22.2 \pm 8.9	1,998.4
<i>D. contrajerva</i>	Metanólico	62.1 \pm 3.2	50.5 \pm 5.8	43.3 \pm 4.5	1,000.2
<i>B. crassifolia</i>	Metanólico	62.2 \pm 4.8	49.4 \pm 4.1	40.7 \pm 5.1	1,077.3
<i>G. sepium</i>	Metanólico	63.4 \pm 4.1	41.3 \pm 3.9	24.8 \pm 4.3	1,802.2
<i>P. pseudoaureum</i>	Metanólico	64.9 \pm 4.5	24.7 \pm 3.9	11.2 \pm 4.3	1,455.6
Ácido kójico					0.7143

CI_{50} : Concentración inhibitoria del 50%. Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y farmacia, USAC.

IX. DISCUSIÓN

La tirosinasa es la enzima encargada de catalizar la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración de la piel. La producción, distribución y acumulación de niveles excesivos de melanina tiene como resultado la hiperpigmentación dérmica; es por esta razón que su inhibición se ha convertido en una de las estrategias más importantes para el desarrollo de nuevos agentes blanqueadores y ha cobrado gran importancia en los productos médicos y cosméticos (Casañola et al., 2012).

Con el propósito de encontrar nuevos agentes despigmentantes de la piel, se obtuvieron extractos metanólicos (disolvente polar) y diclorometánicos (disolvente apolar) de ocho plantas utilizadas para afecciones dermatológicas y evaluar su potencial como inhibidor de la enzima tirosinasa. Los porcentajes de rendimiento más altos se obtuvieron en el solvente polar para la mayoría de las plantas; *G. sepium* fue la planta con mayor rendimiento en ambos disolventes (29.01% en metanol y 27.05% en diclorometano).

Existen muchos factores que influyen directamente en el porcentaje de rendimiento: las partes de las plantas de las que se obtuvo el extracto (Gómez, 2008), el método, la temperatura y presión de extracción, la naturaleza química de los metabolitos secundarios (polaridad) y su afinidad al disolvente de extracción (Durst & Gokel, 1985). Las moléculas presentes en las plantas de este estudio poseen características polares, por lo que fueron disueltas y arrastradas con mayor eficiencia por el metanol (Cuadro 1).

Para la evaluación de la actividad antitirosinasa de los extractos, se estandarizó una metodología cualitativa (cromatografía en capa fina) y una cuantitativa (espectrofotometría). El propósito de la estandarización de ambas técnicas fue obtener un método que permita de forma reproducible y confiable la determinación de la actividad antitirosinasa.

El método en cromatografía en capa fina permitió evidenciar zonas de inhibición de la enzima tirosinasa al observarse áreas incoloras después de agregar el revelador (L-tirosina). Entre los metabolitos a los cuales se les atribuye actividad antitirosinasa, además del ácido kójico, están algunos polifenoles como la 1,2-benzopirona (cumarina); por lo que en este estudio, ambas moléculas se utilizaron como controles positivos, para la evaluación cualitativa (Draeos, 2007). Los controles positivos presentaron distintos valores de Rf; para el ácido kójico fue entre 0.26-0.28 y para 1,2-benzopirona de 0.84-0.85; además de mostrar resultados reproducibles en las cuatro réplicas, a un nivel de confianza del 90% ($\alpha= 0.1$ y $p=0.5$) (Cuadro 2).

Otros estudios demuestran que esta prueba cualitativa es sensible, pues se han determinado límites mínimos detectables de 0.7 μg para ácido kójico (Momtaz et al., 2008), lo que es una ventaja que presenta el método para realizar tamizajes de extractos con actividad inhibitoria.

Para evaluar cuantitativamente la actividad inhibitoria de la tirosinasa se realizó una medición espectrofotométrica a 492 nm, donde solamente se utilizó ácido kójico como control positivo, ya que ha demostrado ser el agente natural con mayor actividad antitirosinasa (Chairi et al., 2010). El propósito de la validación de la metodología cuantitativa fue determinar la

concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) de los extractos y compararla con el ácido kójico, cuya CI₅₀ para este estudio fue de 0.7143 µg/mL (Cuadro 6).

Se evaluó estadísticamente la linealidad de la prueba a través de una curva de calibración dosis-efecto del ácido kójico, y se obtuvo un coeficiente de correlación (r) y de determinación (r²) igual a 0.995 y 0.991, respectivamente; lo que indica que existe una relación estrecha entre las concentraciones y el porcentaje de actividad antitirosinasa, estos datos corresponden a una curva patrón, calculada a partir de otras curvas de calibración, cuya correlación lineal es significativa para el nivel de confianza requerido ($\alpha=0.05$).

La precisión fue evaluada por las diferentes réplicas realizadas, mostrando una buena reproducibilidad (determinada con los resultados de las curvas de calibración) y una buena reproducibilidad (mediante la curva patrón realizada con el ácido kójico), pues en ambos casos los coeficientes de variación obtenidos fueron <5%; de acuerdo con los criterios de aceptación, se puede afirmar que el método es preciso. (Villegas, Acereto & Vargas, 2006). En cuanto a la sensibilidad, estudios previos revelan que la metodología es sensible, ya que se han detectado CI₅₀ mínimas de 0.49 µg/mL correspondientes a extractos vegetales (Chairi et al., 2010); en este estudio la concentración mínima determinada fue la del control positivo, ácido kójico, (CI₅₀ 0.7143 µg/mL) (Cuadro 6), esto es una ventaja para identificar extractos vegetales con actividad inhibitoria a bajas concentraciones.

La especificidad de ambas pruebas, cualitativa y cuantitativa, se basa en la afinidad enzima-sustrato (tirosinasa y L-tirosina), la cual fue evidenciada por los controles positivos, esto

es una ventaja de las metodologías, ya que con certeza permiten la determinación de actividad antitirosinasa en extractos vegetales.

En el ensayo cualitativo de los extractos vegetales se puede observar que todas las zonas incoloras se encuentran a una misma distancia, lo que indica que no hubo una buena separación de las moléculas que componen los extractos, esto se debe a la afinidad entre los extractos y el tipo de eluyente utilizado (Fried & Sherma. 1999), lo cual influyó en el Rf obtenido, pues las moléculas fueron arrastradas todas juntas por la fase estacionaria sin lograr una óptima separación. La limitación de la separación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos no permitió evidenciar claramente la reacción y a pesar de la presencia de zonas incoloras de diferente tamaño, los resultados fueron no conclusivos para la actividad antitirosinasa.

Para evaluar si las zonas incoloras de los extractos ensayados, obtenidas en la cromatografía en capa fina, son o no significativas y analizar la capacidad de los extractos de inhibir la tirosinasa, se realizó la técnica cuantitativa. Se inició con una concentración de 2 mg/mL y se encontró que cinco extractos presentaron actividad inhibitoria >50%; por lo que se disminuyó la concentración a 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL; sin embargo en los resultados de los extractos con concentración de 0.5 mg/mL, ninguno de los extractos presentó actividad inhibitoria. Estos resultados demuestran que ninguno de los extractos del estudio posee actividad antitirosinasa comparable a la del ácido kójico, por lo que no se recomienda su uso en dermatología.

Dentro de las limitaciones del estudio, está la polaridad de los extractos y de los disolventes, pues su naturaleza puede afectar su disolución y por consiguiente las concentraciones finales. Otro aspecto que determina la estabilidad de la enzima es el pH, ya que cambios en la concentración de iones hidronio alteran la acción de la enzima (Gomara et al., 2004). Se observó también que el tiempo afecta la evaluación de la actividad enzimática, ya que a tiempos prolongados disminuía la actividad antitirosinasa, pudiendo obtener de esta forma falsos negativos.

Al comparar el método cualitativo y cuantitativo, los resultados de la actividad antitirosinasa son concordantes, ya que los extractos con zonas de inhibición mayores fueron los que presentaron mayor actividad inhibitoria en la técnica cuantitativa, sin embargo a una concentración de 0.5 mg/mL, ningún extracto presentó un porcentaje de inhibición >50%.

X. CONCLUSIONES

1. Se estandarizaron metodologías con un nivel de significancia de $\alpha=0.1$ para la prueba cualitativa y $\alpha=0.05$ para la prueba cuantitativa por espectrofotometría.
2. La prueba cualitativa no permitió evaluar la actividad antitirosinasa de los extractos vegetales debido a la pobre separación de los metabolitos secundarios presentes.
3. Los extractos metanólicos de *D. contrajerva* y *B. crassifolia* presentaron una $CI_{50} > 1$ mg/mL siendo esta una concentración muy elevada para su posible desarrollo como fitofármaco.
4. Los extractos ensayados, en relación con el ácido kójico (control positivo) no poseen actividad antitirosinasa y por tanto no se pueden utilizar para la aplicación dérmica como despigmentantes.

XI. RECOMENDACIONES

1. Tomar en cuenta la polaridad de los extractos y eluyentes para la realización de un fraccionamiento bioguiado y poder lograr una correcta separación e identificación de los compuestos activos de extractos evaluados en estudios futuros.
2. Mantener el pH y la temperatura de la reacción enzimática, para favorecer la estabilidad de la metodología y obtener resultados sin sesgo.
3. Evaluar la actividad antitirosinasa de otras plantas que tengan aplicación dérmica popularmente.

XII. REFERENCIAS

Adjanohoun, E. (1985). Contributionaux études ethnobotaniques *et floristiques a la Dominique*.

París: Agence de coopération culturelle et technique.

Alster, T. (2001). Laser therapy for cutaneous. *Dermatology Therapy*, 14, 54.

Arenas, R. (1996). *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. México: McGraw Hill

Interamericana.

Ayensa, E. (1981). *Medicinal plants of the West Indies Algonac*. USA: Algonac, Reference

Publications.

Azhar-ul-Haq, Malika, A., Khan, M., Anwar-ul-Haq, Khan, S., Ahmada, A. & Choudhary, M.

(2006). Tyrosinase inhibitory lignans from the methanol extract of the roots of *Vitex negundo* and their structure–activity relationship. *Phytomedicine*, 13, 255–260.

Balbachas, A. & Rodríguez, H. (1990). Las Plantas Curan. USA: *Reformation Herald Publishing*

Association.

Barajas, L., Herreño, N., López, O., Pombo, L., Mejía, A. & Salama, A. (2007). *Monografía de*

Calahuala - Phlebodium pseudoaureum (Cav.) Lellinger. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Bartlett, J. & Stirling, M. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*, 226, 3-6.

Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q. & Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 155-158.

Béjar, E. & Malone, M. (1993). Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. *Journal Ethnopharmacology*, 39, 141-158.

Bérdy, J., Aszalo, A., Bostian, M. & McNitt, K. (1982). *Handbook of Antibiotic Compounds*. Florida, BR: Sringer.

Bultman, J. & Charles, R. (1976). Natural resistance of tropical American woods to terrestrial wood-destroying organisms. *Biotropical*, 8, 71-95.

Cáceres, A. (2011). Caracterización de la actividad antioxidante de extractos de especies nativas del género *piper* y cuantificación de metabolitos secundarios con potencial de desarrollo. Proyecto 17-2009. Guatemala: FODECYT.

Cáceres, A. (1999). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria USAC.

Cáceres, A. (2009). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Editorial Universitaria.

- Cáceres, A., Alvarez, A., Ovando, A. & Samayoa, B. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal Ethnopharmacology*, 31, 193-208.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B. & Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal Ethnopharmacology*, 30, 55-73.
- Cáceres, A., Girón, L., Alvarado, S. & Torres, M. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal Ethnopharmacology*, 20, 223-237.
- Cáceres, A., Rastrelli, L., De Simone, F., De Martino, G., Saturnino, C., Saturnino, P. & Aquino, R. (2001). Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*. 72, 376-381.
- Casañola, G., Marrero, T., Hassan, M., Arther, A., Khan, K. et al. (2007) Dragon method for finding novel tyrosinase inhibitors: *Biosilico* identification and experimental in vitro essays. *European Journal of Medical Chemistry*. 42, 1370-1381.
- Castelo, E., Ricalde, O. & Panero, J. (2005). *Catálogo de Autoridades de Asteráceas Mexicanas y actualización de tribus Heliantheae y Eupatorieae*. University of Texas. (Base de datos SNIBCONABIO proyectos V004, AE012 y CS011).

Chan, E., Lim, Y., Wong, L., Lianto, F., Wong, S., Lim, K. et al. (2007). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109, 477–483.

Charlet E. *Cosmética para farmacéuticos*. Zaragoza: Acribia, 1996

Chiari, M., Joray, M., Ruiz, G., Palacios, S. & Carpinella, M. (2010). Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: Isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chemistry*, 120, 10-14.

Cobian, G. (2007). *Evaluación de extractos de las hojas de Gliricidia sepium (Jacq.) en la inhibición de Sataphylococcus aureus y Candida Albicans*. Instituto politécnico nacional. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada. Mexico D.F.

Cronquist, A. (1987). *Introducción a la Botánica*. México: Editorial Continental.

Curto, E., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glantt, H., Santis, C., Virador, V. & Dooley, T. (1999). Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 57(1), 663-672.

Dereure, O. (2001). Drug-induced skin pigmentation: epidemiology, diagnosis and treatment. *American Journal of Dermatology*, 2, 253-63.

Dharwan, B., Patnaik, G., Rastogi, R., Singh, K. & Tandon, J. (1977). Screening of Indian plants for biological activity. *Indian Journal Experimental Biology*, 15, 208-219.

Díaz, N., Ruiz, A., Reyes, E., Cejudo, A., Novo, J., Peinado, J., et al. (2010). *Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Córdoba: Universidad de Rabanales, Facultad de Medicina.

Domínguez, X., Sánchez, H., Suárez, M., Baldas, J. & González, M. (1989). Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Médica*, 55, 208-209.

Draelos, Z. (2007). Skin lightening preparations and the hydroquinone. *Journal of Dermatology Therapy*, 20, 8-13.

Duke, J. (1985). *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Durst, H. & Gokel, G. (1985). *Química Orgánica Experimental*. España: Editorial Reverté, S. A.

Fernández, M. (2012). *Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K.: estudio fitoquímico y farmacológico*. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.

Ferrandiz, C. (2001). *Dermatología Clínica*. (2^{da} Ed.), Madrid: Elsevier Scientific Publishers Ireland Limited.

- Fitzpatrick, T. & Mosher, D. (1987). *Pigmentación de la piel y trastornos del metabolismo de la melanina*. (11^a ed.), Principios de Medicina Interna. México: Interamericana.
- Fried, B. & Sherma, J. (1999). *Thin-Layer Chromatography*. Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Garfín, D. (1990). Isoelectric focusing. *Methods in Enzymology*, 182, 459–477.
- Gómez, A. (2008). Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies Piperaceas (*P. Jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*) Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Grateau, G. (2000). Amyloidosis physiopathology. *Joint Bone Spine*, 3, 164–70.
- Halder, R. (2004). Management of dyschromias in ethnic. *Dermatology Therapy*, 17, 151-157.
- Hammond, C. (1999). *Experimental organic techniques*. USA: Freeman & Company.
- Hann, S. & Kim, J. (1995). Detection of antibodies to human melanoma cell in vitiligo by western blot analysis. *Yonsei Medical Journal*, 36, 457-61.
- Herath, H., Dassayanake, R., Priyadarshani, A., De Silva, S., Wanigamma, G. & Jamie, J. (1998). Isoflavonoids and a pterocapan from *Gliricida sepium*. *Phytochemistry*, 47, 117-119.

- Hoffman, C. (2003). Vitamin B12 Deficiency: A case report of ongoing Cutaneous hyperpigmentation. *Cutis*, 71, 127-30.
- Huft, M. (1994). *Smilacaceae*. Universidad de México. *Flora Mesoamericana*, 6, 20–25.
- Hughes, C. (1987). Biological considerations in designing a seed collection strategy for *Gliricidia sepium* (Leguminosae). *Commonwealth Forestry Review*, 66, 31-48.
- Kaufmann, O., Koch, S., Burghardt, J., Audring, H. & Dietel, M. (1998). Tyrosinase, melan A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. *Modern Pathology*, 11, 740-6.
- Kim Y., Yun J., Lee C., Lee H., Min K., et. al., (2002) Oxyresveratrol and Hydroxystilbene Compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 18, 16340–16344
- Ko, H., Chiang, Y., Tsai, M., Liang, C., Hsu, L., Li, S., Wang, M., Yen, F. & Lee, C. (2014). Eupafolin, a skin whitening flavonoid isolated from *Phyllanthus nodiflora*, down regulated melanogenesis: role of MAPK and AKT pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 386-393.
- Ko, H., Chiang, Y., Tsai, M., Liang, C., Hsu, L., Li, S., Wang, M., Yen, F. & Lee, C. (2014). Whitening and Antioxidative Constituents from the Aerial Part of *Phyllanthus nodiflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 1

- Kubo, M. & Matsuda, H. (1995). Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis. *Flavor and Fragrance Journal*, 8, 48–55.
- Kulik, J., Nowecki, Z. & Rutkowski, P. (2001). Detection of circulating melanoma cells in peripheral blood by a two marker RT-PCR assay. *Melanoma Research*, 11, 65-73.
- Liang, C, Lim, J, Kim, S, & Kim, D. (2012). Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. *Food Chemistry*, 139, 146-148.
- Lacz, N. (2004). Postinflammatory hyperpigmentation: a common but troubling condition. *International Journal of Dermatology*, 43, 5.
- Lee, K., Kim, B. & Kim, J. (1997). Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science*, 19, 291–298.
- Leis, V., Arranz D. & Díaz R. (2010). Discromías de hiperpigmentación. *Hospital Infanta Sofía San Sebastián de los Reyes*. 47-53. Extraído el 10 de Enero, 2012, de http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1759/47/00470053_LR.pdf.
- Lim, T., Lim, Y. & Yule, C. (2009). Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species, *Food Chemistry*, 114, 594–599.

- Lin, Y., Hsu, F., Chen, C., Chern, J. & Lee, M. (2007). Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochemistry*, 68, 1189–1199.
- Linares, E., Bye, R. & Flores, B. (1990). *Tés Curativos de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Liu, S, Huang, H, Liu, R, Ren, G, Shao, F, Ye, Y & Lin, T. (2013). A new lyoniresinol derivative from *Smilax microphylla*. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang, China.
- Martínez, M., Cazare, L., García, A., González, A. & Moreno, M. (1999). Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia*. *Journal Ethnopharmacology*, 66, 79-82.
- Martínez, R., Herrera, M., Castillo, J., Carrillo, E., & Villatoro, E. (1990). *Plantas Medicinales utilizadas en el área mam de Huehuetenango parte I*. Memorias V Congreso Nacional Plantas Medicinales, Guatemala.
- Mena, G. (1994). *Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la Flora Salvadoreña*. (2ª Ed.), El Salvador: Universidad de El Salvador.

- Mohd, A., Vimala, S., Abdull, A., Rohana, S., Jamaluddin, M. & Juliza, M. (2008). Antioxidant and antityrosinase properties of malaysian bamboo leaf extracts. *Journal of Tropical Forest Science*, 20, 123–131.
- Moin, A., Jabery, Z. & Fallah, N. (2006). Prevalence and awareness of melasma during pregnancy. *Internacional Journal of Dermatology*, 45, 285-288.
- Momtaz, S., Mapunya, B., Houghton, P., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S. & Lall, N. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 507–512.
- Moran, R. (1996). *Polypodiaceae*. En: Davidse, G., Sousa, M. & Chater, A., (Eds.). *Flora Mesoamericana Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden y The Natural History Moseum*, pp. 130-133.
- Morton, J. (1977). Some folk-medicine plants of Central America markets. *Quarterly Journal of Crude Drug*, 15, 165-192.
- Narayanaswamy, N., Duraisamy, A. & Balakrishnan, K. (2011). Screening of some Medicinal Plants for their Antityrosinase and Antioxidant activities, *International Journal of PharmTech Research*, 1107-1112
- Nash, N. (1974). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24, 324-325.

Nicolas, J. (1999). *Plantas Mèdicinales des Mayas K'ichè du Guatemala*, Paris: Ibis Press

Noppakun, N. & Swasdikul, D. (1986). Reversible hyperpigmentation of skin and nails with white hair due to vitamin B12 deficiency. *Archives of Dermatological Research*, 122, 896-899.

Ocampo, R. & Balick, M., (2009). *Plants of Semillas Sagradas: An Ethnomedicinal Garden in Costa Rica*. USA: Finca Luna Nueva, Extractos de Costa Rica, S.A.

Ocampo, R. & Maffioli, A. (1987). *El Uso de Algunas Plantas Medicinales en Costa Rica*. San José: Trejos Hermanos.

Ocampo, R., Martínez, J. & Cáceres, A. (2007). *Manual de Agrotecnología de Plantas Medicinales Nativas*. San José, Costa Rica: Sanabria.

Okunji, C., Komarnytsky, S., Ribnicky, D., Awachie, P., Ito, Y., Raskin, I., Fear, G. & Poulev, A. (2007). Preparative isolation and identification of tyrosinase inhibitors from the seeds of *Garcinia kola* by high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1151, 45-50

Ortiz, B., & Brower, C. (1985). Chemical bases for medicinal plant use in Oaxaca, Mexico. *Journal Ethnopharmacology*, 13, 57-88.

- Özer1, Ö., Mutlu, B. & Kıvçak, B. (2007). Antityrosinase activity of some plant extracts and formulations containing ellagic acid. *Pharmaceutical Biology*, 45, 519–524.
- Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. & Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 201-214.
- Paul, T. & Rose, M. (2009). Pigmentary disorders. *Medical Clinics of North America*, 93.
- Pearl, G. (2006). Increasing our understanding of pigmentary disorders. *Journal American Academy Dermatology*, 54, 55-61.
- Pennington, T. & Sarukhan, J. (1968). Arboles tropicales de México. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales.
- Pereira, J. (1855). *The Elements of Materia Medica and Therapeutics*. Londres: Longman, Brown, Green y Longmans.
- Perez, C., Hernandez, M., Cruz, P., Hernandez, G. & Bolio, G. (2014). Efecto antihelmíntico in vitro del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 105-111.
- Picardo, M. & Carrera, M. (2007). New and Ex-perimental Treatments of Cloasma and Other Hypermelanoses. *Dermatology Clinic*, 25, 353–362.

- Portillo, G. (2007) Evaluación de extractos de las hojas de *Gliricidia sepium* (Jacq) en la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. (Tesis doctoral). Centro de Investigación de Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada
- Prignano, F., Ortonne, J., Buggiani, G. & Lotti, T. (2007). Therapeutical approaches in melasma. *Dermatology Clinics*, 25, 337–342.
- Ribot, R. (2006). Despigmentantes. *Revista Acofar*, 457, 28-30.
- Roque, J. (1941). *Flora Médico Guatemalteca*. Guatemala: Tipografía Nacional.
- Rout, S. & Banerjee, R. (2007). Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresource Technology*, 98, 3159–3163.
- Samayoa, C., Palacios, M. & Cáceres, A. (2005). Inhibición de *Gardnerella vaginalis* por extractos vegetales utilizados en el nororiente y suroccidente de Guatemala para el tratamiento de vaginitis. *Revista Científica, Actividad biocida de especies vegetales nativas de la flora Mesoamericana*, 3, 14-18.
- Shin, N., Ryu, S., Choi, E., Kang, S., Chang, I., Min, K. & Kim, Y. (1998). Oxyresveratrol as the Potent Inhibitor on Dopa Oxidase Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243, 3

Smith, I. & Feinberg, J. (1965). *Paper & Thin Layer Chromatography and Electrophoresis*.
London: Shandon Scientific Company Limited.

Soubiran, P., Benzaken, S., Bellet, C., Lacour, J. & Ortonne, J. (1985). Vitiligo: peripheral T-cell subset imbalance as defined by monoclonal antibodies. *British Journal of Dermatology*, *113*, 124-127.

Standley, P. & Williams, L. (1970). *Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany: USA, Chicago.

Stratigos, A. & Katsambas, A. (2004). Optimal management of hyperpigmentation in dark-skinned patients. *American Journal Clinical Dermatology*, *5*, 161-180.

Teleguario, C. (2008). *Caracterización y cuantificación de flavonoides, saponinas esteroidales en extractos de tres plantas Mesoamericanas Lippia graveolens (Orégano), Passiflora edulis (Maracuyá) y Smilax dominguensis (Zarzaparrilla)*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Farmacia. Guatemala.

Ul Haq, A., Malik, A., Khan, M., Ul Haq, A., Khan, S., et. al., (2006) Tyrosinase inhibitory ligands from the metanol extract of the roots of *Vitex negundo* Linn. and their structure-activity relationship. *Phytomedicine* *13*, 255-260

Vargas, J., Muñoz, C., Osorio, C. & Garcia, E. (1983). Anapsos, an antipsoriatic drug which increases the proportion of suppressor cells in human peripheral blood. *Annales de l'Institut Pasteur Immunology*, *134*, 393-400.

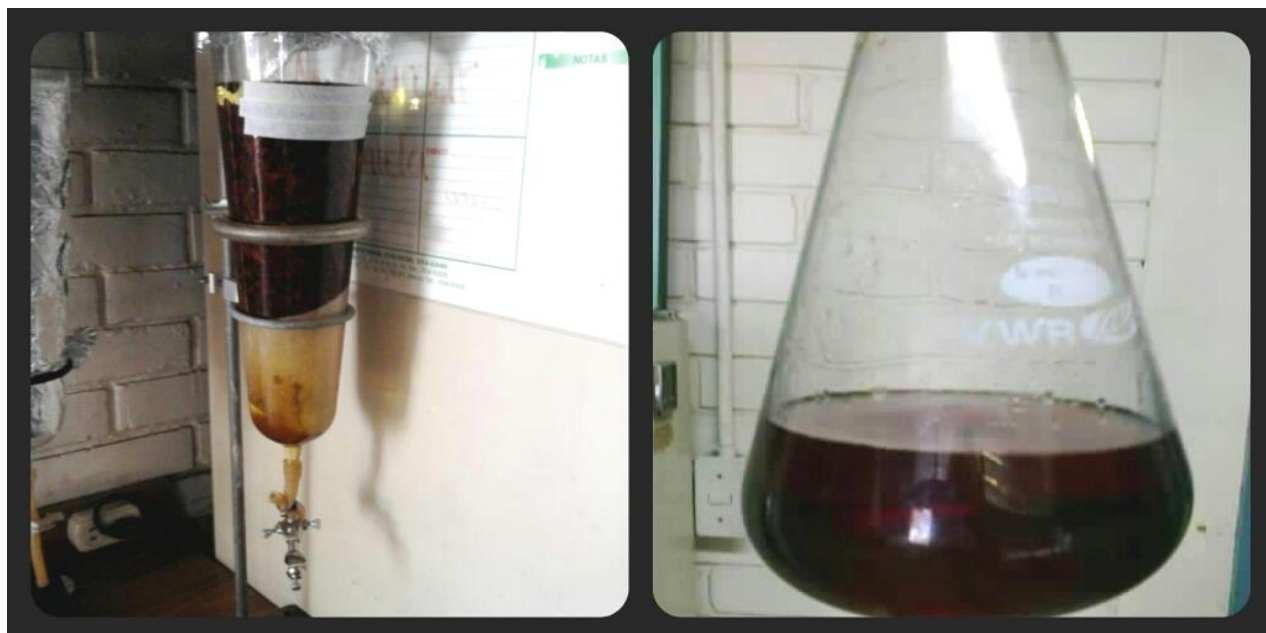
- Vázquez, M. & Moreno, J. (2004). Trastornos de la pigmentación en niños. *Pediatría Integral*, 8, 327-347.
- Victor, F., Gelber, J. & Rao, B. (2004). Melasma: a review. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 8, 97-102.
- Villegas, C, Acereto, E & Vargas, Q. (2006). Análisis ultravioleta visible. La teoría y la práctica en el ejercicio profesional. *Editorial Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida Yucatán* pp 1-20.
- Wang, H., et al. (2010). (-)-N-Formylanonaine from *Michelia alba* as a human tyrosinase inhibitor and antioxidant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 5241–5247.
- Willard, H. (1988). *Instrumental Methods of Analysis*. United States: Wadsworth Incorporated.
- Wu, B, Yue, M, Yuan, J & Sun, Q. (2010). Isolation and identification of chemical constituents from stems of *Smilax glabra* Roxb. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*. China.
- Xie, L., Chen, Q., Huang, H., Wang, H. & Zhang, R. (2003). Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*, 68, (4), 487-491.

Yan Y., Jian-Hong C., Hui W., Hong X., Gui-Xin C., et al., (2010) Involvement of p38 MAPK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of San-bai-tang, a Chinese herbal formula, in B16 cells. *Journal of Ethnopharmacology*,132, 533-535.

Zhou, J., Shang, J., Ping, F., & Zhao, G. (2012). Alcohol extract from *Vernonia anthelmintica* (L.) Willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes. *Journal of Ethnopharmacology*,143, 2.

XIII. ANEXOS

Fotografía 1. Percolación fraccionada de la planta seca.



Percolación del material vegetal seco de *Byrsonima crassifolia* utilizando diclorometano como disolvente elaborado en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, USAC.

Fotografía 2. Concentración del extracto vegetal en rotavapor.



Concentración del extracto vegetal de *Byrsonima crassifolia* con recuperación del disolvente (metanol) a temperatura ambiente en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, USAC.

Fotografía 3. Obtención y almacenamiento del extracto vegetal.



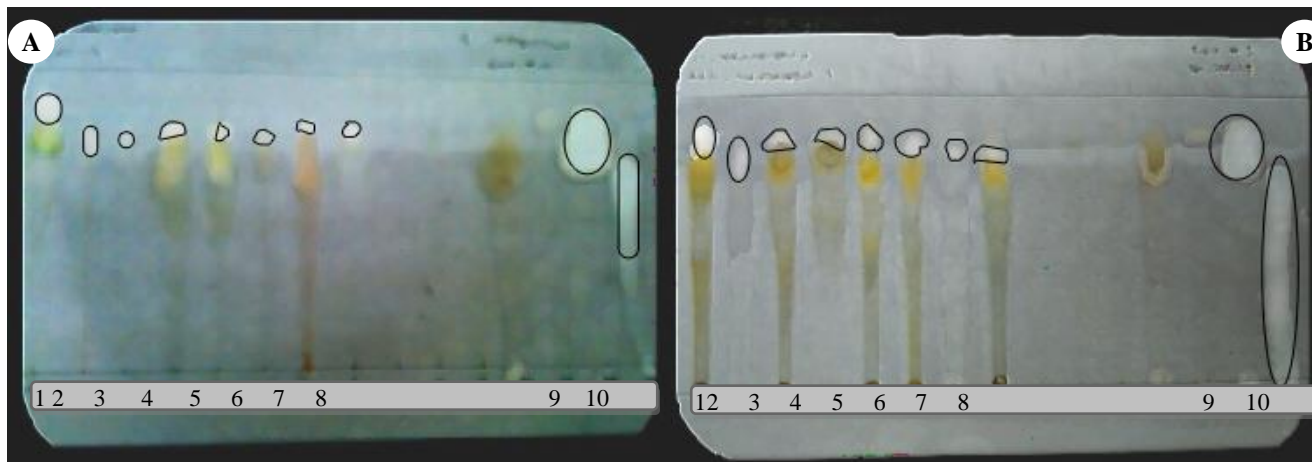
Extracto vegetal metanólico de *Byrsonima crassifolia* desecado y almacenado a 7 °C en frascos color ámbar. Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, USAC.

Fotografía 4. Evaluación de actividad antitirosinasa de los extractos vegetales mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC).



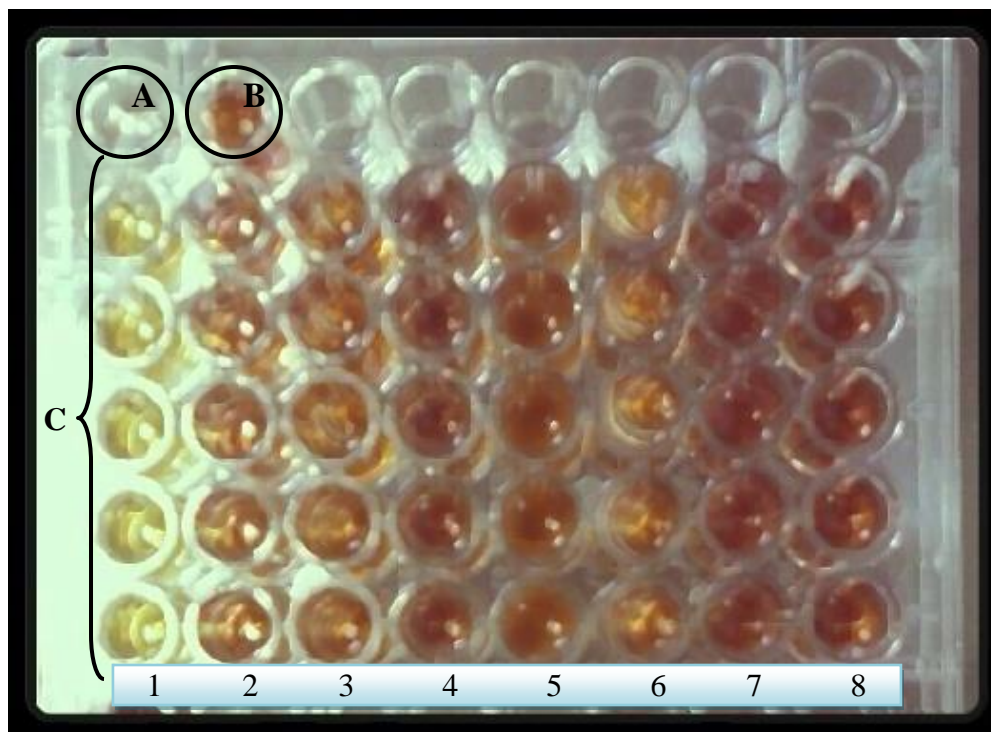
Cámara cromatográfica compuesta por una fase móvil (acetona/metanol 1:49) y una fase sólida (placa de sílica gel), cargada con los extractos vegetales metanólicos a evaluar. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), USAC.

Fotografía 5. Determinación cualitativa de actividad antitirosinasa de extractos vegetales.



Placas cromatográficas cargadas con extractos vegetales y controles positivos con concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$. A: Extractos diclorometánicos y B: Extractos metanólicos (1) *D. contrajerva*, (2) *B. crassifolia*, (3) *G. sepium*, (4) *L. graveolens*, (5) *L. guatemalensis*, (6) *P. pseudoaureum*, (7) *S. domingensis*, (8) *V. deppeana* (9) control positivo de 1,2-benzopirona y (10) control positivo de ácido kójico. Se observan áreas de actividad inhibitoria (zonas incoloras) delimitadas con una línea negra en todos los extractos y controles. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), USAC.

Fotografía 6. Evaluación cuantitativa de actividad antitirosinasa de extractos vegetales.



Valoración de actividad antitirosinasa por espectrofotometría (2 mg/mL). A: Ácido Kójico (Control positivo). B: Blanco. C. Extractos metanólicos. (1) *D. contrajerva*, (2) *B. crassifolia*, (3) *G. sepium*, (4) *L. graveolens*, (5) *L. guatemalensis*, (6) *P. pseudoaureum*, (7) *S. domingensis* y (8) *V. deppeana*. La actividad antitirosinasa es inversamente proporcional a las absorbancias. Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, USAC.

Amanda Margarita Agustín Gómez
Autora

Axel Ernesto Martínez Castellanos
Autor

Jeremy Omar Ortiz Juárez
Autor

Moramay de los Ángeles Calderón Arias
Autora

Lic. Armando Cáceres
Asesor

Licda. Ana Margarita Paz
Revisora

MSc. María Eugenia Paredes
Directora

Dr. Rubén Velásquez
Decano