

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DEL EXTRACTO HIDROMETANÓLICO ELABORADO A PARTIR DEL EPICARPIO DE LOS FRUTOS DE *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso)

PRESENTADA POR:

Br. KEYLY DENISA CAHUANA MENDOZA

Br. ELISA BLANCA MORALES QUISPIÑO

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORA:

Dra. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ

CO-ASESOR:

Mgt. ROGER GIANCARLO GUTIERREZ CHAVEZ

CUSCO - PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro. CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DEL EXTRACTO HIDROMETANÓLICO ELABORADO A PARTIR DEL EPICARPIO DE LOS FRUTOS DE Citrus jambhiri Lush. (Limón rugoso)

presentado por: KEYLY DENISA CAHUANA MENDOZA con DNI Nro.: 76067300 presentado por: ELISA BLANCA MORALES QUISPINO con DNI Nro.: 47961451 para optar el título profesional/grado académico de QUÍMICO FARMACÉUTICO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 8%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 12 de mayo de 2025

Firma

Post firma CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ

Nro. de DNI 23945000

ORCID del Asesor 0000 - 0001 - 7487 - 354X

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio:
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:458375282

Keyly Denisa Cahuana Mendoza

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LA FRACCIÓN CLO...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:458375282

Fecha de entrega

12 may 2025, 8:19 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

12 may 2025, 8:29 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DEpdf

Tamaño de archivo

3.8 MB

105 Páginas

29.187 Palabras

169.140 Caracteres

8% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Filtered from the Report

- ▶ Bibliography
- ▶ Quoted Text
- ▶ Small Matches (less than 12 words)

Exclusions

- ▶ 29 Excluded Matches

Top Sources

- 8%  Internet sources
- 1%  Publications
- 3%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

1 Integrity Flag for Review

-  **Hidden Text**
2 suspect characters on 1 page
Text is altered to blend into the white background of the document.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

DEDICATORIA

- *A mis amados padres Victoriano Cahuana Gutiérrez e Isabel Mendoza Quispe, que siempre me han acompañado en cada logro y me han motivado a levantarme tras una caída, espero que esta tesis los haga sentir orgullosos.*
- *A Jefferson Lima Quispe, mi amado esposo, por tu apoyo ilimitado e incondicional, por siempre impulsarme a ser mejor y continuar ante cualquier adversidad, mis logros también son tuyos y hoy los comparto alegremente.*
- *A Franco Adalwolf, mi amado hijo, mi príncipe hermoso, tú eres mi fortaleza, a ti te dedico todos mis logros, porque tú eres la fuente de mis aspiraciones.*
- *A mis hermanos Delfín, Elías, Evit, Maria, Victoria Isabel, Isabel Carmin y Yolinda Milecia por sus palabras motivadoras.*
- *A mis sobrinos Yeni, Elvis, Deysi, Erika, Izel, Samy, Karen, Lenon, Iker, Valenthina, Luciana, Gael y Mia, espero que esta tesis les sea un ejemplo a superar, los incentive a estudiar y ser profesionales.*
- *A las Químicos Farmacéuticos Patricia Quispe y Alexia Aguilar por sus palabras de aliento y motivación que me subían los ánimos para continuar en esta meta trazada.*

Keyly Denisa Cahuana Mendoza

DEDICATORIA

- *A Dios todopoderoso, el que guía mi camino en los momentos más dificultosos de mi existencia.*
- *A mi amada madre Antonia Quispiño Roque por ser mi motivo, mi esfuerzo y por su apoyo ilimitado en mi trabajo arduo para alcanzar mis metas.*
- *A mi amado padre Tomas Morales Ylachoque, quien siempre me ha apoyado e impulsado a seguir mis metas y mis sueños y no rendirme a los obstáculos de la vida.*
- *A mis hermanos, Noe, Norma, Dorcas, Natanael y Ever por siempre estar a mi lado, por su apoyo incondicional y brindarme buenos consejos.*
- *A mi amiga Keyly, por haber creído en mí, gracias por su buena energía y por su buena motivación.*

Elisa Blanca Morales Quispiño

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a nuestra Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por acogernos en su seno durante toda nuestra formación profesional.

Agradecemos a nuestra escuela profesional de Farmacia y Bioquímica y a toda su plana docente, es gracias a ellos que nos formamos con una base sólida en ética, valores y visión científica.

Nuestro agradecimiento sincero a nuestra asesora la Dra. Carla del Carpio Jiménez, por su excelencia profesional, por compartirnos sus conocimientos y experiencia en la realización de esta investigación y por su apoyo constante.

Agradecer también al Mgt. Ciro Tomaylla Cruz y al Mgt. Roger Giancarlo Gutiérrez Chávez por su apoyo en la ejecución de esta investigación.

Keyly Denisa Cahuana Mendoza y Elisa Blanca Morales Quispiño

RESUMEN

El objetivo del presente estudio es la determinación de la actividad anti-tirosinasa y la actividad antioxidante de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso). Los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. fueron recolectados en el C.C.P.P. Toctohuaylla, distrito de Huanquite, Provincia de Paruro, Región Cusco a 2719 m.s.n.m. El proceso de extracción constó de dos etapas, la primera realizada con metanol al 80% por la técnica de maceración y la segunda es propiamente el fraccionamiento con cloroformo. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó por el método Folin-Ciocalteu. En la determinación de la inhibición de la enzima tirosinasa se utilizó el Kit de cribado de inhibidores de la tirosinasa MAK257 Sigma-Aldrich, que se fundamenta en el método colorimétrico y se tuvo como control positivo el ácido kójico. En la determinación de la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos espectrofotométricos, el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y el radical libre ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS+), teniendo el trolox como control positivo.

Los resultados en la identificación fitoquímica evidenciaron presencia en abundante cantidad de azúcares reductores y compuestos fenólicos, presencia en regular cantidad de flavonoides, quinonas, taninos, alcaloides, lactonas sesquiterpénicas y ausencia de saponinas. La cuantificación de compuestos fenólicos mostró que la muestra presenta 965.4 mg GAE/g FC. En la determinación de la actividad anti-tirosinasa el IC_{50} = 187.66 μ g/mL y los resultados en la actividad antioxidante fueron: por el método DPPH la muestra tuvo el IC_{50} = 210.580 μ g/mL, TEAC= 145.66 mg TE/g FC y por el método ABTS la muestra tuvo un IC_{50} = 56.401 μ g/mL, TEAC= 690.786 mg TE/g FC.

Se concluye que la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush, presenta un importante contenido de compuestos fenólicos, presenta actividad anti-tirosinasa y antioxidante de interés científico.

Palabras clave: *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), Actividad anti-tirosinasa, Actividad antioxidante, Compuestos fenólicos.

SUMMARY

The objective of this research is to determine the anti-tyrosinase and antioxidant activity of the chloroform fraction of the hydromethanolic extract prepared from the epicarp of the fruits of *Citrus jambhiri* Lush. (Rough lemon). The fruits of *Citrus jambhiri* Lush. were collected at the Toctohuaylla town center, Huanquite district, Paruro Province, Cusco City at 2719 m.a.s.l. The extraction process consists of two stages, the first one carried out with 80% methanol by the maceration technique and the second one is properly the fractionation with chloroform. The phenolic compounds quantification was carried out by the Folin-Ciocalteu method. The MAK257 Sigma-Aldrich Tyrosinase Inhibitors Screening Kit was used to determine tyrosinase enzyme inhibition, which is based on a colorimetric method, with kojic acid as a positive control. Two spectrophotometric methods were used to determine antioxidant activity: the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) and the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid free radical (ABTS+), with trolox as a positive control.

Phytochemical identification results showed abundant presence of reducing sugars and phenolic compounds, presence in a regular amounts of flavonoids, quinones, tannins, alkaloids, sesquiterpene lactones, and the absence of saponins. Quantification of phenolic compounds showed that the study sample presents 965.4 mg GAE/g FC. In the determination of the anti-tyrosinase activity the IC_{50} for the sample was 187.66 $\mu\text{g/mL}$; and, the results in the antioxidant activity were, By the DPPH method the sample had the $IC_{50} = 210.580 \mu\text{g/mL}$, TEAC= 145.66 mg TE/g FC and by the ABTS method the sample had an $IC_{50} = 56.401 \mu\text{g/mL}$, TEAC = 690.786 mg TE/g FC.

In conclusion, the chloroform fraction of the hydromethanolic extract prepared from the epicarp of *Citrus jambhiri* fruits has an important content of phenolic compounds, presents anti-tyrosinase and antioxidant activity of scientific interest.

Keywords: *Citrus jambhiri* Lush. (Rough lemon), Anti-tyrosinase activity, Antioxidant activity, Polyphenols.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
SUMMARY	v
ÍNDICE GENERAL	vi
INDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	2
GENERALIDADES	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Justificación e importancia	3
1.5. Hipótesis	4
CAPÍTULO II.....	5
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	5
2.1. Visión histórica.....	5
2.2. Antecedentes del estudio	6
2.2.1. Antecedentes internacionales	6
2.2.2. Antecedentes nacionales	10
2.2.3. Antecedentes locales	12
2.3. Estado de la cuestión.....	12

2.4. Bases teórico-científicas	13
2.4.1. Especie vegetal: <i>Citrus jambhiri</i> Lush.....	13
2.4.1.1. Clasificación taxonómica.....	13
2.4.1.2. Descripción morfológica	14
2.4.1.3. Origen, distribución geográfica y hábitat.....	14
2.4.1.4. Aspectos bioquímicos y composición química.....	15
2.4.1.5. Usos tradicionales y medicinales.....	16
2.4.2. Piel y melanogénesis	16
2.4.2.1. Anatomía y fisiología de la piel.....	16
2.4.2.1.1. Epidermis	17
2.4.2.2. Melanocitogénesis	18
2.4.2.3. Melanogénesis	20
2.4.2.4. Alteraciones en la pigmentación cutánea	21
2.4.2.4.1. Principales hiper Cromías	21
2.4.3. EFECTO ANTI-TIROSINASA.....	22
2.4.3.1. Enzima tirosinasa	22
2.4.3.2. Inhibición enzimática	22
2.4.3.2.1. Cinética enzimática	22
2.4.3.2.2. Factores que influyen en la cinética enzimática.....	23
2.4.3.2.3. Cinética de la inhibición enzimática.....	23
2.4.3.3. Inhibidores de la enzima tirosinasa	24
2.4.4. EFECTO ANTIOXIDANTE	25
2.4.4.1. Radicales libres.....	25
2.4.4.2. Antioxidantes	26
2.4.4.3. Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante.....	26
2.4.5. Metabolitos secundarios: extracción e identificación	26
2.4.6. Compuestos fenólicos: Clasificación y cuantificación	27
2.4.6.1. Clasificación de los polifenoles y ejemplos.....	27
2.4.6.2. Cuantificación de polifenoles: MÉTODO Folin-Ciocalteu.....	28

2.4.7. Modelos experimentales utilizados en investigación biomédica	28
2.5. Marco conceptual.....	28
CAPÍTULO III.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. Materiales	30
3.2. Diseño metodológico.....	32
3.3. Criterios de inclusión y exclusión	33
3.4. Identificación, definición y operacionalización de variables	33
3.4.1. Variables implicadas	33
3.4.2. Variables no implicadas	35
3.5. Procedimiento de la investigación	37
3.6. Metodología	38
3.7.1. Técnica:	47
3.7.2. Instrumentos:	47
CAPÍTULO IV	48
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
4.1. Obtención del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush.	48
4.2. Fraccionamiento del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush. (Limón rugoso) y porcentaje de rendimiento de la extracción	48
4.3. Análisis fitoquímico cualitativo.....	49
4.4. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	50
4.4.1. Curva de calibración con ácido gálico	50
4.4.2. Cuantificación de compuestos fenólicos de la fracción clorofórmica.....	51
4.5. Determinación de la actividad anti-tirosinasa	52
4.5.1. Curva de calibración con ácido kójico	52
4.5.2. Determinación de la concentración inhibitoria (IC50) del patrón ácido kójico	53
4.5.3. Curva de calibración de la muestra	53
4.5.4. Determinación de la concentración inhibitoria (IC50) de la muestra.....	55

4.6. Determinación de la actividad antioxidante	56
4.6.1. Por el método DPPH.....	56
4.6.1.1. Curva de calibración con trolox	56
4.6.1.2. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC50) del trolox.....	56
4.6.1.3. Porcentaje de captación de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra en estudio.	57
4.6.1.4. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC50) de la muestra en estudio.	58
4.6.1.5. Determinación de la actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush. por el método DPPH.	58
4.6.2. Por el método ABTS	59
4.6.2.1. Curva de calibración con trolox	59
4.6.2.2. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC50) del trolox.....	60
4.6.2.3. Porcentaje de captación de ABTS a diferentes concentraciones de la muestra en estudio.	60
4.6.2.4. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC50) de la muestra en estudio.	61
4.6.2.5. Determinación de la actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de <i>Citrus jambhiri</i> Lush. por el método ABTS.	62
CONCLUSIONES	63
SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS.....	76

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Fruto de limón rugoso en diferentes estados de maduración.....	14
FIGURA 2: Capas de la piel y anexos cutáneos	17
FIGURA 3: Capas de la epidermis.....	17
FIGURA 4: Estructura del melanocito.....	19
FIGURA 5: Vías de transducción de señales y factores de transcripción que contribuyen a la diferenciación de melanocitos	19
FIGURA 6: Etapas de desarrollo de los melanosomas	20
FIGURA 7: Vía biosintética de la melanina.....	21
FIGURA 8: Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten	23
FIGURA 9: Cinéticas de la inhibición enzimática	24
FIGURA 10: Modelos de Experimentación	28
FIGURA 11: Procedimiento General de la Investigación	37
FIGURA 12: Procedimiento de la obtención del extracto seco hidrometanólico.....	38
FIGURA 13: Procedimiento de la obtención de la fracción clorofórmica	39
FIGURA 14 Preparación de reactivos para la determinación de compuestos fenólicos	40
FIGURA 15: Procedimiento para la preparación de la enzima Tirosinasa.....	42
FIGURA 16: Preparación del sustrato de tirosinasa	42
FIGURA 17: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón ácido gálico versus sus valores de absorbancia	50
FIGURA 18: Gráfica de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón ácido kójico versus el porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa.....	52
FIGURA 19: Gráfica de dispersión y línea de tendencia de la concentración de la muestra versus el porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa	54
FIGURA 20: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón trolox versus el porcentaje de captación de DPPH.	56
FIGURA 21: Gráfico de dispersión con los valores de porcentaje de captación de DPPH por las muestra a diferentes concentraciones.	57
FIGURA 22: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón trolox versus el porcentaje de captación de ABTS.	60
FIGURA 23: Gráfico de dispersión con los valores de porcentaje de captación de ABTS por las muestra a diferentes concentraciones.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Historia del uso de los agentes blanqueadores en la piel.....	5
TABLA 2: Origen, distribución geográfica y hábitat del género Citrus	15
TABLA 3: Principales hipercromías.....	21
TABLA 4: Clasificación de los polifenoles ejemplos.	27
TABLA 5: Diseño de prueba de la actividad anti-tirosinasa in vitro.....	32
TABLA 6: Diseño de prueba de la actividad antioxidante in vitro	33
TABLA 7: Cuadro de Operacionalización de variables.....	36
TABLA 8: Pruebas de Identificación Fitoquímica	39
TABLA 9: Procedimiento para la elaboración de la curva patrón con ácido gálico y determinación de la cantidad de compuestos fenólicos en la muestra en estudio.....	40
TABLA 10: Preparación de las disoluciones de la muestra en estudio	41
TABLA 11: Preparación de la curva patrón de ácido kójico.....	41
TABLA 12: Preparación de los pocillos para el ensayo anti-tirosinasa	43
TABLA 13: Preparación de las cubetas para el ensayo antioxidante por el método DPPH	45
TABLA 14: Preparación de las cubetas para el ensayo antioxidante por el método ABTS.....	46
TABLA 15: Determinación del porcentaje de extracción	49
TABLA 16: Análisis Fitoquímico Cualitativo de la Fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de Citrus jambhiri Lush.	49
TABLA 17: Resultados de las absorbancias del ácido gálico	50
TABLA 18: Resultados de las absorbancias para la cuantificación de compuestos fenólicos en la especie en estudio	51
TABLA 19: Contenido de compuestos fenólicos en la muestra en estudio	51
TABLA 20: Porcentajes de inhibición de la enzima tirosinasa a diferentes concentraciones de ácido kójico	52
TABLA 21: Resultados de las absorbancias de la muestra.	53
TABLA 22: Porcentajes de inhibición de la enzima tirosinasa a diferentes concentraciones de la muestra	54
TABLA 23: Porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de trolox .	56
TABLA 24: Resultados del porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de la muestra	57
TABLA 25: Porcentaje de captación de ABTS a distintas concentraciones de trolox .	59
TABLA 26: Resultados del porcentaje de captación de ABTS a distintas concentraciones de la muestra	60

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Certificación de la especie en estudio Citrus jambhiri Lush.	I
ANEXO 2 Ficha de recolección de datos para determinar el porcentaje de rendimiento	II
ANEXO 3 Ficha de recolección de datos para realizar el análisis fitoquímico cualitativo	II
ANEXO 4 Ficha de recolección de datos para la cuantificación de compuestos fenólicos en la especie en estudio Citrus jambhiri Lush.	II
ANEXO 5: Ficha de recolección de datos para la actividad inhibitoria in vitro de la enzima tirosinasa de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de Citrus jambhiri Lush.	III
ANEXO 6: Ficha de recolección de datos para determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de Citrus jambhiri Lush.	V
ANEXO 7: Ficha de recolección de datos para determinar la actividad antioxidante por el método ABTS de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de Citrus jambhiri Lush.	VI
ANEXO 8 Registro fotográfico	VII
ANEXO 9 Boletín técnico del kit de cribado de inhibidores de la tirosinasa	XII

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS:	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ACTH:	Hormona adrenocorticotrópica
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AK:	Ácido kójico
CC.PP.:	Centro poblado
CE:	Equivalente de Catequina
CHCl₃:	Tricloruro de metilo o cloroformo
Cu.	Cobre
DE	Desviación estándar
DOPA:	Dihidroxfenilalanina
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FC:	Fracción clorofórmica/chloroform fraction
FRAP:	Capacidad de Reducción del Hierro
GAE:	Equivalente a ácido gálico
H₂O₂:	Peróxido de Hidrogeno
HCl:	Ácido clorhídrico
HPLC:	Cromatografía Líquida de alta precisión
IC:	Conductividad eléctrica
IC₅₀:	Concentración inhibitoria 50
kHz:	kiloHertz
MART-1:	Antígeno de melanoma reconocido por células T-1
Mg:	Magnesio
MITF:	Factor de transcripción inductor de melanocitos
mM:	Milimolar
MSH-α:	Hormona estimulante del melanocito alfa
mS/cm:	mili Siemens por centímetro
NaCl:	Cloruro de sodio
NO:	Óxido nítrico
O₂[*]	Radical superóxido
*OH	Radical hidroxilo

PF:	Peso fresco
PKCβ:	Proteína quinasa C de tipo β
PMEL17:	Proteína de melanocito 17
PS:	Peso seco
ROO*	Radical peroxi-alquil
SCF:	Factor de células madre
TE:	Equivalente trolox
TEAC:	Capacidad antioxidante equivalente a trolox.
TRP-1:	Proteína-1 relacionada con la tirosinasa humana
TRP-2:	Proteína-2 relacionada con la tirosinasa humana
UPLC-qTOF-MS:	Cromatografía líquida ultraperformance acoplada a Espectrometría de masa de tiempo de Vuelo con Cuadrupolo
UV:	Ultravioleta
WNT:	Sitio de integración relacionado con Wíngles.
ζ	Potencial zeta o potencial electrocinético

INTRODUCCIÓN

Las hiperpigmentaciones son ocasionadas y/o agravadas por diversos factores como la radiación UV, trastornos y cambios hormonales, alteraciones cutáneas, estados de déficit, uso de cosméticos y algunos medicamentos (1). Pueden darse a consecuencia de la acumulación de algún elemento en la piel como la carotenodermia o por aumento del pigmento melanina (hipermelanosis) (2).

La hipermelanosis se caracteriza por una mayor producción y acumulación de melanina (hiperpigmentación melanótica) o un aumento en el número de melanocitos (hiperpigmentación melanocítica), la mayor producción de melanina está relacionada con la mayor actividad en las enzimas melanogénicas como es la tirosinasa, enzima que cataliza el proceso de oxidación de la tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), y de DOPA a DOPA-quinona, precursor de los diferentes tipos de melanina. La tirosinasa es la enzima clave en la tonalidad de la piel, el cabello y el color de los ojos (3,4).

Los productos aclaradores de la piel se utilizan para obtener un tono de piel más claro y/o uniforme, también se utilizan para el tratamiento clínico de la hipermelanosis. Los agentes aclarantes actúan en varios niveles de la melanogénesis, muchos de ellos son conocidos como inhibidores competitivos de la enzima tirosinasa, otros agentes aclarantes inhiben la maduración de esta enzima o el transporte de melanosomas de los melanocitos a los queratinocitos (4).

Actualmente se busca agentes aclarantes de origen natural, menos tóxicos y amigables con el ecosistema, entre los que mejor destacan con estas propiedades son los polifenoles, que además presentan actividad antioxidante. Estos metabolitos secundarios están presentes en muchas especies como el ginseng, la uva, el eucalipto, la mandarina, la toronja, el limón, naranja, romero, caléndula y avena (5).

En los últimos años, ha cobrado interés, la búsqueda de valores añadidos a los desechos de las frutas, tales como la cáscara de los cítricos, que han demostrado tener un alto contenido de polifenoles, que previenen el estrés oxidativo celular, y derivadas de esta función se tienen muchos otros beneficios, los cuales son de interés en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (6).

El objetivo de la presente investigación es valorar la potencialidad dermatológica que tiene la cáscara de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (limón rugoso), residuos de un fruto cítrico del cual no se tiene mucha información en lo que respecta al contenido en metabolitos secundarios y sus propiedades beneficiosas. Específicamente se determinará la acción que tienen sobre la hipermelanosis, primeramente, conociendo su contenido en compuestos fenólicos y determinando in vitro la inhibición de la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante, lo cual no solo será conocimiento nuevo, sino también le dará un valor agregado a los residuos de este fruto.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. Planteamiento del problema

Los trastornos de la pigmentación cutánea consisten en un aumento exagerado o disminución del color normal de la piel (2). La hipermelanosis es el resultado de una producción aumentada de melanina, acumulación de la misma o elevada cantidad de melanocitos (7). Todas las personas, al margen de la raza, edad o sexo, presentan lesiones pigmentarias benignas; sin embargo, muchas de ellas son indeseables para sus portadores, quienes buscan su tratamiento o eliminación, recurriendo a diferentes terapias como son los medicamentos inhibidores de la melanización (8).

Las irregularidades en la piel, para muchas personas constituyen un problema estético, y en muchos casos esto también tiene repercusión en la percepción de la imagen propia y en la autoestima, por ejemplo el melasma, que es una de las hiperpigmentaciones más comunes asociadas a la exposición crónica a luz visible y radiación UV, estimulación hormonal y factores genéticos, tiene un gran potencial para causar malestar psicológico, predominantemente en la población femenina (7,9).

A lo largo del tiempo, se han utilizado diversos agentes aclarantes, muchos sin sustento científico como los productos con mercurio y otros con efectos tóxicos como la hidroquinona que a altas concentraciones posee efecto carcinógeno (10,11).

En los últimos años la búsqueda de agentes aclarantes está centrada en la investigación de compuestos naturales poseedores de metabolitos secundarios capaces de inhibir la enzima tirosinasa, como los polifenoles. En especies cítricas se han identificado flavonoides inhibidores de la tirosinasa, como la naringina, narirutina, hesperidina y neohesperidina presentes en los frutos de *Citrus hassaku* (12). En la cáscara de *Citrus mitis* se identificó el 3',5'-di-C- β -glucopiranosilfloretilina con mayor inhibición de la tirosinasa comparado a la naringina y hesperidina también presentes (13). En la cáscara de *Citrus unshiu* y otros frutos cítricos se identificó la nobiletina con prometedora inhibición de la tirosinasa (14,15).

En el estudio realizado por Huanca N. y colaboradores: "Percepción del riesgo de cáncer de piel en un hospital de altura" en la ciudad de Cusco, encontraron que el 8.3% de 56 pacientes encuestados refieren tener melasma (16). Otro estudio realizado en el Hospital de Referencia Daniel Alcides Carrión en la Ciudad de Lima, reveló que la mayoría de mujeres afectadas por melasma provenían de la Sierra Sur del país (Cusco, Ayacucho, Arequipa y Puno) (17).

Con esta investigación se busca precisar si la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), posee propiedades aclarantes en términos de inhibición de la enzima tirosinasa, cual es la concentración que inhibirá en un 50% la actividad de esta enzima y si el extracto puede neutralizar los radicales libres, con la única finalidad de que a futuro se pueda utilizar este extracto en formulaciones farmacéuticas y cosméticas con propiedad aclarante de la piel.

1.2. Formulación del problema

¿Presentará actividad antioxidante y actividad anti-tirosinasa in vitro la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso)?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Determinar la actividad anti-tirosinasa y la actividad antioxidante in vitro, de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso).

1.3.2. Objetivos específicos

1. Obtener el extracto hidrometanólico a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso).
2. Fraccionar el extracto hidrometanólico previamente obtenido, utilizando el solvente cloroformo $CHCl_3$ mediante el método de maceración y determinar el porcentaje de rendimiento final.
3. Realizar el análisis fitoquímico cualitativo de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso).
4. Determinar el contenido de compuestos fenólicos en la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), utilizando el método Folin-Ciocalteu.
5. Determinar in vitro la actividad inhibitoria sobre la enzima tirosinasa a diferentes concentraciones de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) y establecer la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}).
6. Determinar in vitro la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS, establecer la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC_{50}) de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) y expresar los resultados en equivalentes trolox (TEAC).

1.4. Justificación e importancia

a. Conocimiento

La especie *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) es una especie que hasta la actualidad en nuestro país tiene limitada información científica. Este estudio aporta conocimiento sobre la composición cualitativa, el contenido de polifenoles, la actividad antioxidante y la actividad anti-tirosinasa del extracto de la cáscara del Limón rugoso, proporcionando una base científica para futuras investigaciones de formulaciones cosméticas y farmacéuticas con propiedad aclarante.

b. Aplicabilidad

Las hipermelanosis constituyen meramente un problema estético que genera una gran demanda de productos cosméticos, además de los fotoprotectores se utilizan formulaciones despigmentantes tópicos y orales, comercialmente existen productos con

agentes inhibidores de la producción de melanina, muchos de los cuales son conocidos como inhibidores competitivos de la tirosinasa (18). Esta investigación brinda la información necesaria para formular cremas cosméticas con propiedad aclarante o productos farmacéuticos para el tratamiento de las hipermelanosis.

c. Prioridad

Gran parte de la población que habita en la Sierra Peruana presenta hipermelanosis, principalmente en el rostro, esto a causa del característico clima frío con abundante radiación solar de día, siendo más prevalente en el sexo femenino en edad fértil; además, la enzima tirosinasa está relacionada con el melanoma, la cual representa más del 80% de las muertes por cáncer de piel, ya que durante la tumorigénesis aumenta la expresión y actividad de esta enzima, y por otro lado el metabolismo del cáncer genera radicales que provocan un mayor daño en el ADN, activando las señales celulares que evitan la muerte celular (19,20).

d. Social

Por otro lado, la especie *citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) crece en pequeños valles y distritos de la provincia de Paruro y Calca de la región Cusco, en su mayoría estos poblados como es el CC. PP. Toctohuaylla, están en total abandono por parte de sus autoridades, careciendo de servicios como el transporte y viéndose limitados a poder mejorar y comercializar sus productos, por lo que con esta investigación se pretende incrementar el interés de la población por este fruto, y por ende centrar mayor atención en los poblados donde se cultiva, con el fin de abrir mayores posibilidades a sus habitantes.

e. Medio ambiental

Finalmente hay que resaltar que la cáscara del limón rugoso, en general de los cítricos, constituye un residuo desechable, no comestible y sin valor económico, sin embargo, con los resultados de esta investigación, habrá mayor atención por los residuos de esta especie y muchas otras especies cítricas, por parte de las industrias alimentarias, farmacéuticas y cosméticas, reduciendo así el impacto medio ambiental.

1.5. Hipótesis

La fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), presenta actividades anti-tirosinasa y antioxidante in vitro.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1. Visión histórica

El uso de los cítricos abarca todas las especies y civilizaciones, Dioscórides menciona a los cítricos en su tratado de medicina, y en Japón escritos que datan del periodo Nara, describen a los cítricos y sus usos, paralelamente a la evolución de los cítricos, se ha desarrollado la historia de los extractos, en el año 1500 G. B. Della Porta, describe la obtención del aceite esencial destilando flores de naranjo amargo, del año 1650 datan las primeras referencias de la extracción manual de la esencia de Bergamota en Calabria (Italia) y posteriormente en el siglo XX, se conocería la extracción con máquinas, a gran escala (21).

Otro punto en la historia es el uso de diferentes sustancias para resaltar una piel más clara o pálida (Tabla 1), que data de las primeras civilizaciones.

TABLA 1: Historia del uso de los agentes blanqueadores en la piel

AGENTES ACLARANTES A TRAVÉS DE LA HISTORIA	
SIGLO III	Los romanos utilizaban una mezcla de harina de habas, tiza, yeso y albayalde (carbonato cálcico de plomo) para blanquearse la piel.
SIGLO IX	Las mujeres griegas se espolvoreaban la cara de oro blanco y rojo. En Mesopotamia también se blanqueaban la piel.
MEDIEVO	La mujer ideal debía ser rubia y pálida.
SIGLO XVI	Las venecianas se maquillaban el rostro y el torso, e impusieron en Europa el gusto por el cabello rojo, que era obtenido por exposición al sol de los cabellos untados con mezclas de alumbre, azafrán, miel y sulfuro negro. En Inglaterra para blanquear la piel de la cara, el escote y eliminar manchas, utilizaban productos peligrosos a base de mercurio.
SIGLO XVII	Las jóvenes europeas se aclaraban el pelo con lejía, se blanqueaban sus rostros, el cuello y las manos con solimán, un sublimado corrosivo a base de mercurio y cloro.
SIGLO XIX	Utilizaban la hidroquinona monobencil éter y acetato de octilo mezclada con hipoclorito sódico, sin embargo esta loción resultaba muy agresiva para la piel.
SIGLO XX	La sal de mercurio y sus derivados (cloruro mercurioso, óxido de mercurio rojo, mercurio amoniacal y cloruro mercúrico) eran consideradas sustancias muy efectivas para blanquear la piel.
SIGLO XXI	La hidroquinona es restringida al comprobar que a concentración del 5% causa enrojecimiento y quemaduras en la piel.

Adaptado de: LCI Bogotá. “Historia del maquillaje. De los orígenes hasta la profesionalización del oficio” (10).

2.2. Antecedentes del estudio

2.2.1. Antecedentes internacionales

Avalos M. (2022) “Evaluación del Extracto Etanólico y de Fracciones Obtenidas por Carbonización Hidrotérmica Procedentes del Epicarpio de Frutos de Aguacate (*Persea americana* Mill. Cultivar Hass) Sobre Marcadores de Envejecimiento Celular Cutáneo”. Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo.

La presente tesis de diseño experimental tiene por **objetivo** general determinar el efecto del extracto etanólico procedente del epicardio de aguacate (*Persea americana* Mill. Cultivar Hass) y de los bioaceites obtenidos por carbonización hidrotérmica a partir de la biomasa residual extraída, sobre marcadores del envejecimiento cutáneo, los objetivos específicos son: 1. Determinar la presencia de grupos funcionales y la concentración de fenoles, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides, 2. Determinar la capacidad de captación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno involucradas en el envejecimiento celular, 3. Determinar la actividad inhibitoria sobre las enzimas asociadas al deterioro de la matriz extracelular dérmica (tirosinasa, elastasa, hialuronidasa y colagenasa). El **método** que utilizaron para la determinación de grupos funcionales fue la Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier considerando un rango de longitud de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , para la determinación química de las fracciones utilizaron reactivos específicos y espectrofotometría, para evaluar la actividad antioxidante se determinó la concentración necesaria para inhibir el 50% (EC_{50}) de la formación de especies oxidantes relevantes durante el proceso de envejecimiento cutáneo: H_2O_2 , O_2^* , ROO^* , *OH y NO^* por medio de espectrofotometría. Para la determinación de la capacidad inhibitoria de la enzima tirosinasa, utilizaron la tirosinasa de hongo, ácido kójico como control positivo y determinaron el IC_{50} por espectrofotometría. Los **resultados** fueron los siguientes: la actividad antioxidante fue mayor en el extracto etanólico de la cáscara frente al óxido nítrico y el radical peroxilo, los bioaceites ligeros resultaron ser más antioxidantes frente al anión superóxido y al radical hidroxilo. La actividad de los bioaceites pesados para inhibir la tirosinasa y elastasa fue superior al de otras fracciones. El estudio **concluye** que el uso combinado de la extracción convencional y la carbonización hidrotérmica maximiza el número de fracciones bioactivas a partir de la cáscara de aguacate representando una solución para el aprovechamiento racional de este subproducto alimenticio (22).

Luque A., Velazquez M., Hernández C., Graciano A., García N. Iriqui J., Silvas M., Zazueta A., Moreno M. y Hernández P. (2022). “Efecto antioxidante de Nanopartículas Compuestas de Zeína y Extracto de Naranja (*Citrus sinensis*) obtenido por extracción asistida por ultrasonido”.

La presente investigación tuvo por **objetivo** preparar extracto de la cáscara de naranja y producir nanopartículas de zeína contenidas de este extracto, para luego evaluar su capacidad antioxidante. **Métodos:** para la elaboración del extracto, una vez con la muestra pulverizada (2.5 g en 10 mL de agua) utilizaron un limpiador ultrasónico a frecuencia de 20kHz, amplitud del 30% y dos periodos de 10 min con un minuto de descanso, seguida de una filtración y centrifugación a 4°C y 30 min a 6000 rpm, finalmente el extracto filtrado se liofilizo, para evaluar la interacción entre la zeína y el extracto se utilizaron técnicas de evolución del potencial ζ y espectroscopia infrarroja transformada de Fourier, para la evaluación del potencial antioxidante utilizaron las técnicas ABTS, FRAP y DPPH. Los **resultados** obtenidos por dispersión dinámica de

luz y microscopia electrónica de barrido indicaron que las nanopartículas de zeína con extracto de naranja presentaron tamaño nanométrico y forma esférica, presentando un diámetro hidrodinámico de 159.26 ± 5.96 nm. En las pruebas de actividad antioxidante, los ensayos ABTS y DPPH no indicaron diferencias significativas a altas concentraciones de extractos, sin embargo, las nanopartículas de Zeína con extracto fueron más efectivos a bajas concentraciones. El estudio **concluye** que la extracción en agua es un método efectivo para obtener los compuestos fenólicos de la cáscara de naranja, y el método de nanoprecipitación en las condiciones utilizadas permitió obtener partículas en el rango nanométrico con potencial ζ positivo, el ensayo de actividad antioxidante indicó una alta capacidad antioxidante tanto en el extracto como en las nanopartículas de zeína con extracto, este estudio presenta la posibilidad de obtener extractos de naranja por ultrasonido y acoplarlos a sistemas nanoparticulados basados en zeína para ser aplicados como materiales biomédicos funcionalizados con sustancias antioxidantes de utilidad farmacéutica (23).

Anticona M. (2022) “Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en zumos y extractos de residuos, obtenidos por ultrasonidos, de mandarinas híbridas”. (Universidad de Valencia).

La presente tesis de diseño experimental tuvo como **objetivo** general estudiar y caracterizar el zumo y los extractos de la cáscara obtenidos por ultrasonidos, de tres variedades de mandarinas híbridas (Nadorcott, Clemenvilla y Ortanique). **Métodos:** El extracto de la piel de mandarina fue obtenida por extracción asistida por ultrasonidos, en el análisis físico-químico de las muestras se determinó los parámetros físicos (conductividad, °Brix y pH), se determinó compuestos fenólicos mediante HPLC-UV y UPLC-qTOF-MS y la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y TEAC. Los **resultados** obtenidos (para los extractos de piel de mandarina) de los parámetros físico-químicos, muestran que para la conductividad eléctrica en las tres variedades aumenta, dependiendo del tiempo de extracción; sin embargo, la variedad Clemenvilla tratado por ultrasonido por 30 minutos tiene el IC mas alto (0.32 ± 0.13 mS/cm \pm DE), lo que indica que en esta variedad existe mayor salida de electrolitos del interior de las células, respecto a los °Brix el valor medio obtenido para las tres variedades fue de 16.2 ± 0.6 , respecto al pH los valores medios difieren entre las 3 variedades, pero no se observa mucha variación con respecto al tiempo de extracción. En la determinación de compuestos bioactivos se observó que el contenido de compuestos fenólicos totales aumenta según el tiempo de extracción y la variedad Ortanique es la que tiene el mayor contenido a los 30 minutos de extracción (1230 ± 310 mg GAE/100 g PF), respecto a la concentración de flavonoides totales, la variedad Clemenvilla obtuvo el contenido más alto en flavonoides totales (76.7 ± 22.4 mg CE/100 g PF), respecto a la concentración de carotenoides totales la variedad Nadorcott mostro mayor contenido, y respecto al contenido de ácido ascórbico la variedad Clemenvilla mostro mayor contenido. Para la determinación de la capacidad antioxidante observaron que la capacidad antioxidante aumentaba como se aumentaba el tiempo de extracción, teniendo que la variedad Clemenvilla tenía la mayor actividad antioxidante por el método DPPH (12.2 ± 4.3 mmol TE/100 g PF). El estudio **concluye** que la aplicación de ultrasonidos es un método eficaz para el proceso de extracción, de acuerdo con el contenido de compuestos bioactivos, las características físico-químicas y la capacidad antioxidante, esta última está influenciada por el contenido en flavonoides y el ácido ascórbico (24).

Ilyas H., Hanif U., Ali A., Hassan Tarar Z., Javed H., Tahir T. Y Rafiq M. (2021) “Potencial Anti-tirosinasa y Anti-oxidante de los Extractos Metanólicos de Partes Seleccionadas de *Citrus bergamia* y *Ficus carica*”.

La presente investigación tuvo por **objetivo**, probar *in vitro* el potencial anti-tirosinasa y antioxidante en los extractos metanólicos de hojas, cáscara y pulpa de los frutos de *Citrus bergamia*; y, hojas y frutos de *Ficus carica* que fueron procesados por destilación fraccionada usando acetato de etilo, n-hexano y cloroformo. Los **métodos** que utilizaron fueron: para el análisis de la capacidad antioxidante, la técnica de DPPH y para la actividad anti-tirosinasa utilizaron tirosinasa de hongo, tampón fosfato y L-DOPA, luego realizaron las lecturas a 450 nm. En los **resultados** para la actividad anti-tirosinasa en las hojas de *Citrus bergamia* obtuvieron que el extracto metanólico crudo posee un IC_{50} de $151.3 \pm 29 \mu\text{g/mL}$, el destilado con hexano: $24.6 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$, el destilado en acetato de etilo: $6.1 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ y el destilado con cloroformo: $12.9 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$, los resultados anti-tirosinasa en la cáscara de *Citrus bergamia* fueron: para el extracto metanólico destilado con hexano un IC_{50} de $142.7 \pm 21.2 \mu\text{g/mL}$, el destilado en acetato de etilo: $4.1 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ y el destilado con cloroformo: $35.2 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$, los resultados anti-tirosinasa en la pulpa de *Citrus bergamia* fueron: para el extracto metanólico crudo un IC_{50} de $366.8 \pm 36.5 \mu\text{g/mL}$, el destilado en acetato de etilo: $17.4 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ y el destilado con cloroformo: $10.6 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$. Para la actividad antioxidante en los extractos crudos los resultados fueron los siguientes: para las hojas de *Citrus bergamia* se obtuvo un IC_{50} de $192.7 \pm 28 \mu\text{g/mL}$, para la cáscara: $125.9 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ y para la pulpa: $384.2 \pm 19 \mu\text{g/mL}$. El estudio **concluye** que los extractos metanólicos crudos y los extractos fraccionados con hexano, etil acetato y cloroformo para ambas especies poseen actividad antioxidante y anti-tirosinasa significativa, resaltando el extracto fraccionado con etil acetato de la cáscara de *Citrus bergamia* con la inhibición más alta de la tirosinasa (25).

Delgado M. (2020) “Evaluación de la Capacidad Antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de la Cáscara de la Mandarina (*Citrus reticulata*), en Relación a un Medicamento Antioxidante Comercial”. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales.

El presente estudio es de nivel explicativo y diseño experimental, cuyo **objetivo** fue: “Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), en relación a un medicamento antioxidante comercial, mediante técnicas de laboratorio, para una aplicación en la industria”. Los procesos de extracción se realizaron con Alcohol al 96% en relación 3:1, y agua destilada en relación 4:1, posterior al análisis fitoquímico, para determinar la capacidad antioxidante utilizaron el **método** de DPPH, teniendo como patrón de referencia el ácido ascórbico puro. En sus **resultados** obtuvieron un IC_{50} de $122.96 \mu\text{g/mL}$ para el extracto acuoso y $23.99 \mu\text{g/mL}$ para el extracto alcohólico. El estudio **concluyó** que el extracto acuoso tiene presencia de taninos y fenoles, en cambio el extracto alcohólico adicionalmente tiene flavonoides, para la determinación de la capacidad antioxidante concluyeron que el extracto alcohólico tiene mayor capacidad antioxidante con un porcentaje de inhibición de 64.68%, comprobando así que el extracto etanólico de la cáscara de mandarina tiene una alta capacidad antioxidante, superior a la del medicamento antioxidante comercial, la Vitamina C (26).

Navia A., Ormachea P., Salcedo L., Lozano M., Tarqui S., Flores Y. y Almanza G. (2020). “Determinación del Contenido Fenólico, y Evaluación de la Actividad Antitirosinasa, y de los índices antioxidantes de Cuatro Variedades de Quinoa boliviana”. Universidad Mayor de San Andrés UMSA.

La presente investigación tuvo por **objetivo** estudiar cuatro variedades de quinua boliviana: Quinoa Jacha Grano, Quinoa Real Blanca, Quinoa Real Negra y Quinoa Real Roja, valorizarlas mediante el establecimiento del contenido fenólico, sus índices antioxidantes y medir la actividad antitirosinasa en cada variedad, la extracción se realizó con solvente hidroalcohólico, se aisló, identificó y cuantificó el flavonoide glicosilado endémico de la quinua (mauritanina) mediante los **métodos** cromatográfico y espectroscópico, para determinar la capacidad de inhibición de radicales libres utilizaron el ensayo de ABTS y para determinar la actividad antitirosinasa utilizaron el método de tirosinasa fúngica. Los **resultados** que obtuvieron fueron: La inhibición de la tirosinasa para la mauritanina fue de 74.73% a 1.67 mg/mL y para la actividad antioxidante fue de 1141.38 μ M Trolox /g, y la fracción rica fenólica de Quinoa Jacha Grano mostro 69.89% de inhibición de la enzima tirosinasa y 569.21 μ M Trolox /g de actividad antioxidante. La investigación **concluye** que las especies en estudio podrían tener aplicación en cosmética, dermatología y en el procesamiento de alimentos (27).

Wuttisin N., Boonmak J., Thaipitak V., Thitilerdecha N. Y Kittigowittana K. (2017) “Actividad Anti-tirosinasa del Extracto de Cáscara de Naranja y Formulación Cosmética”. Universidad Mae Fah Luang, Muang, Chiang Rai, Tailandia. Escuela de Ciencias Cosméticas.

La presente investigación planteó los siguientes **objetivos**: “Determinar la actividad anti-tirosinasa del extracto etanólico de la cáscara de naranja, desarrollar una crema aclaradora con el extracto y evaluar la satisfacción de los usuarios”. La extracción se realizó con alcohol al 95% en proporción 1:3, para la determinación del efecto anti-tirosinasa utilizaron el **método** modificado de Chang et al., 2008, teniendo L-Dopa como sustrato y ácido kójico como estándar, se determinó la formación de cromo DOPA, midiendo la absorbancia a 475 nm. En los **resultados** obtuvieron que el extracto etanólico de cáscara de naranja poseía actividad anti-tirosinasa con un IC_{50} de 255.10 μ g/mL, siendo menos eficaz que el ácido kójico, se elaboró la crema aclaradora al 2% p/p, se encontró que la crema de cáscara de naranja podría reducir la melanina en un 17.33%, en los estudios de satisfacción obtuvieron un valor alto con respecto a textura, capacidad de extensión, absorción e hidratación, y una satisfacción moderada en lo que respecta a olor. El estudio **concluye** que el extracto de cáscara de naranja se puede aplicar en la industria cosmética para darle mayor valor a los residuos de la naranja (3).

2.2.2. Antecedentes nacionales

Mera E. Y Papuico L. (2020) “Actividad Anti-tirosinasa y efecto fotoprotector del extracto Etanólico del Tegumento de Dos Variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Ñuña Roja y Negra”. Universidad Norbert Wiener. Lima.

La presente tesis es de carácter experimental empleando el diseño completamente aleatorio (DCA) cuyo **objetivo** fue: “Comprobar la actividad anti-tirosinasa y el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. ñuña roja y negra”. Para la preparación de los extractos se utilizó 7 kilos del frijol, se separó manualmente la cáscara después del remojo en 7 litros de agua destilada, seguidamente la misma fue pulverizada y macerada con una solución etanol: agua (80:20) durante 7 días y la concentración la realizaron en rotavapor. La determinación cualitativa *in vitro* de la actividad anti-tirosinasa se realizó por cromatografía en capa fina utilizando el **método** Wangthong et al, teniendo como estándar ácido kójico y el revelado lo realizaron con soluciones de tirosinasa y tirosina. Los **resultados** para el estudio fitoquímico de las dos variedades dieron la presencia de flavonoides, quinonas, azúcares reductores, alcaloides, polifenoles, lactonas, leucoantocianidinas y mucilagos. En la prueba de la actividad anti-tirosinasa obtuvieron que tanto para los extractos etanólicos de ñuña roja y negra y para el ácido kójico la placa observada en un fondo gris-violeta muestra zonas incoloras correspondiente a la inhibición de la enzima tirosinasa. El estudio **concluye** que los extractos etanólicos del tegumento de las dos especies de *Phaseolus vulgaris* en estudio, cualitativamente evidencian inhibición similar al del ácido kójico sobre la enzima tirosinasa (28).

Condo M. Y Quispe J. (2019) “Efecto Anti-tirosinasa de Extractos Metanólico y Etil Acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. Huando (Naranja)”. “Universidad Nacional Mayor de San Marcos”. Lima

La presente tesis fue de tipo experimental y prospectiva, donde el **objetivo** fue: “Evaluar el efecto anti-tirosinasa de los extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. Huando (naranja) sobre la actividad de la enzima tirosinasa de hongos”. Utilizaron los **métodos**: espectrofotométrico de referencia y cromatográfico. En los **resultados** obtuvieron que ambos extractos tenían presencia de flavonoides, quinonas, alcaloides y polifenoles, en la determinación cualitativa de la actividad anti-tirosinasa realizado por cromatografía fina evidenciaron manchas blancas sobre fondo oscuro, lo que afirma dicho efecto, en la determinación del porcentaje de inhibición por método espectrofotométrico preparados a 5 mg/mL, obtuvieron que el extracto metanólico tiene 44.3% de inhibición de la tirosinasa y el extracto en etil acetato 105.4% de inhibición, los valores IC_{50} del estándar ácido kójico, obtenidos para dichos extractos fueron de 5.23 mg/mL y 0.023 mg/mL respectivamente. El estudio **concluye** que tanto el extracto en etil acetato y el extracto metanólico del epicarpio de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Var. huando (naranja) poseen actividad anti-tirosinasa con amplio interés en tratamientos antimelanogénicos y en la industria cosmética (29).

Ordoñez E., Reátegui D. Y Villanueva J. (2018). “Polifenoles Totales y Capacidad Antioxidante en Cáscara y Hojas de Doce Cítricos”. Universidad Nacional de Trujillo.

El **objetivo** de esta investigación es cuantificar los polifenoles totales y valorar la habilidad antioxidante de las hojas y las cáscaras de frutos maduros de doce especies

de cítricos: Lima Dulce, Limón Cidra, Limón Mandarina, Limón Rugoso (*Citrus jambhiri*), Limón Sutil, Limón Tahití, Mandarina Común, Mandarina Cleopatra, Mandarina Rio De Oro, Naranja Valencia, Tangelo Y Toronja, para la preparación de extractos se utilizó 1.5 gramos de muestra en 30 mililitros de una solución metanol : agua (80:20), que luego fueron agitados por 24h, filtrados y centrifugados a 10000 rpm/10 min a 4°C. Los **métodos** que utilizaron fueron: el método colorimétrico Folin-ciocalteu para cuantificar polifenoles, para determinar la capacidad antioxidante utilizaron el método de los radicales DPPH (100 µL de extracto reaccionan con 900 µL de DPPH, se mide la absorbancia a 515 nm) y ABTS (100 µL de los extractos reaccionan con 900 µL de radical ABTS* preparado previamente). Los **resultados** de *Citrus jambhiri* para la cuantificación de polifenoles expresados en g GAE/100 g muestra fueron: para la cáscara: 1.42 ± 0.03 y para las hojas: 1.95 ± 0.04 , los resultados IC_{50} para la actividad antioxidante fueron: para la cáscara por el método DPPH: 4.26 ± 1.23 mg/mL, por el método ABTS* 247 ± 9.1 µg/mL, para las hojas por el método DPPH 1.85 ± 0.04 mg/mL y por el método ABTS*: 234.6 ± 7.2 µg/mL. El estudio **concluye** que las cáscaras de las 12 especies de cítricos tienen un contenido polifenólico que varía entre 3.22 a 0.79 g GAE/100 g y un IC_{50} que varió entre 1.88 ± 0.45 y 4.26 ± 1.23 mg/mL (DPPH) y de 150 ± 4.9 a 336 ± 15.0 µg/mL (ABTS) (30).

Marreros S. (2018) “Contenido de Polifenoles Totales y Capacidad Antioxidante de las Flores de *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus aurantifolia* (lima) y *Prunus pérsica* (durazno)”. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote.

La presente tesis es de tipo descriptivo, con un nivel de orientación cuantitativo, cuyo **objetivo** fue “Determinar el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de las flores de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantifolia* y *Prunus pérsica*”. Utilizaron los **métodos**: Folin-Ciocalteu para determinar polifenoles y el método DPPH para determinar el potencial antioxidante en el extracto metanólico y acuoso. En los **resultados** obtuvieron que la infusión de las flores de *Citrus sinensis* y *Citrus aurantifolia* tienen mayor contenido en polifenoles comparados a sus respectivos extractos metanólicos y decocción, teniendo así: 47.43 ± 3.44 mg CE/g PS de las flores de *C. sinensis* y 44.67 ± 3.88 miligramos de catequina equivalente/g de muestra seca de flores de *C. aurantifolia*. En la capacidad antioxidante obtuvieron que el extracto metanólico y la infusión en *Citrus sinensis* poseen la mayor capacidad antioxidante con 163.55 ± 1.97 mM TE/g de la muestra y 162.94 ± 6.07 mM TE/g de la muestra respectivamente, y que la decocción en *Citrus aurantifolia* posee la mayor capacidad antioxidante con 208.55 ± 9.24 mM TE/g de la muestra. El estudio **concluye** que se encontró concentraciones considerables de polifenoles tanto en las infusiones, decocción y extractos metanólicos, del mismo modo, comprobaron que las flores de las especies estudiadas poseen buena habilidad para inhibir radicales libres, lo que genera interés para seguir estudiando individualmente los compuestos (31).

Cruz X. (2017). “Determinación de la Acción *in vitro* del Extracto Metanólico de Cedrón (*Lippia citriodora*) Sobre Células de Melanoma Inhibiendo la Melanogénesis y Sobre la Actividad *in vitro* de la Enzima Tirosinasa Sobre el Sustrato L-tirosina”. Universidad Católica Santa María. Arequipa.

El **objetivo** de la presente tesis fue “Determinar la acción *in vitro* del extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) sobre células de melanoma inhibiendo la melanogénesis y sobre la actividad *in vitro* de la enzima tirosinasa sobre el sustrato L-Tirosina”. El **método**

utilizado para evaluar la cinética con y sin extracto de cedrón fue la espectrometría a 280 nm. En los **resultados** se obtuvo que el extracto metanólico de cedrón no es citotóxico, a pesar de ello, no presentó actividad inhibitoria significativa. El estudio **concluyó** que el extracto metanólico de cedrón (*Lippia citriodora*) a una concentración de 40 µg/mL logró una mejor inhibición de la actividad de la enzima tirosinasa comparado a las otras concentraciones (32).

2.2.3. Antecedentes locales

Del Castillo K. (2024). “Actividad Inhibitoria *in Vitro* sobre la Enzima Tirosinasa y Actividad Antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco.

La presente tesis fue de diseño cuasi-experimental, transversal y prospectivo, donde el **objetivo** fue: “Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* sobre la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. (orégano)”. Utilizaron los **métodos**: El método Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles, para la determinación de la inhibición de la enzima tirosinasa utilizaron el método de espectrofotometría, teniendo como patrón ácido kójico 10 mM, el método DPPH para la determinación de la actividad antioxidante, utilizando como patrón trolox. En los **resultados** obtuvieron presencia de compuestos fenólicos en una concentración de 71.37 µg/mL, observaron mayor solubilidad en solventes de carácter polar, para la actividad antioxidante obtuvieron un IC_{50} de 310 µg/mL, para el porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa obtuvieron un IC_{50} de 351.43 µg/mL. El estudio **concluye** que el extracto metanólico de *Origanum Vulgare* L. (Orégano) presenta actividad antioxidante y actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa (33).

Urrunaga M., Del Carpio C., Gutierrez R. Y Tomaylla C. (2023). “Propiedades Fisicoquímicas, Composición Química y Actividad Antioxidante del Aceite Esencial de *Citrus jambhiri* (Limón Rugoso)”. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco.

La presente investigación planteó como **objetivo**, extraer el aceite esencial de la cáscara del fruto del limón rugoso (*Citrus jambhiri*) mediante el **método** de “Destilación por arrastre de vapor de agua”, para luego cuantificar los principales componentes mediante “Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas” y determinar la actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH. En sus **resultados y conclusiones**: obtuvieron 0.72% de rendimiento en la extracción del aceite esencial de *Citrus jambhiri*, y en la cuantificación se obtuvo mayoritariamente monoterpenos hidrocarbonados en un 76.5%, monoterpenos oxigenados en un 15 % y 2.8% de β-cariofileno un sesquiterpeno hidrocarbonado, las propiedades fisicoquímicas obtenidas a 20°C fueron: un índice de refracción de 1.472 ± 0.01 ; una densidad de $0.844 \text{ g/mL} \pm 0.02$; y un pH de 4.7 ± 0.01 . Para el efecto antioxidante determinaron un IC_{50} de $99.8 \pm 5.6 \text{ mg/mL}$ (34).

2.3. Estado de la cuestión

En el ámbito internacional el género Citrus, a lo largo del tiempo, gracias a numerosos estudios está generando mucho interés por sus propiedades biológicas y nutritivas, principalmente por ser poseedores de compuestos bioactivos como son las vitaminas, fibra, compuestos fenólicos, carotenoides, antocianinas, flavanonas y ácido hidrocinámico (35). En los últimos años ha cobrado importancia la reutilización de los

residuos cítricos, como fuente de metabolitos secundarios, la cáscara de los frutos de este género debido a su alto contenido en polifenoles, flavonoides y terpenos son una fuente natural de antioxidantes (30). El aceite esencial de cáscaras de cítricos es una importante sustancia biológicamente activa que contiene de decenas a cientos de compuestos bioactivos con características que promueven la salud (36). La especie *Citrus jambhiri* Lush., no es la excepción, los últimos años ha cobrado importancia principalmente por los beneficios del aceite en la cáscara del fruto, de la cual se ha comprobado su actividad antioxidante y actividad antibacteriana (37). Aunque no se encontraron estudios específicos sobre la actividad anti-tirosinasa de *Citrus Jambhiri* Lush.

En el ámbito nacional, existe una variada producción, donde por varias generaciones se ha cultivado cítricos, en la amazonia, en los valles costeros peruanos, dentro de los cuales está *Citrus jambhiri* Lush. (limón rugoso) (34). Tras una investigación bibliográfica se pudo encontrar que la investigación en residuos cítricos, incluyendo *Citrus jambhiri* Lush., aunque escasa, ya se viene dando en nuestro país, predominando la determinación de la actividad antioxidante y la cuantificación de polifenoles.

En el ámbito local, la especie *Citrus jambhiri* Lush. se cultiva en los Valles cusqueños, como Yanatile y Toctohuaylla. Al realizar revisión bibliográfica se encontró que ya se viene abordando investigaciones en los residuos de este género, para *Citrus jambhiri* Lush. se encontró la determinación de las propiedades fisicoquímicas, composición química y actividad antioxidante del aceite esencial (34).

2.4. Bases teórico-científicas

2.4.1. Especie vegetal: *Citrus jambhiri* Lush.

2.4.1.1. Clasificación taxonómica

Los cítricos pertenecen a la familia de las rutaceas (Orden terebintales), que abarca numerosas especies, alrededor de 1600, la mayor parte de ellas leñosas. Una de las características de estas plantas son las glándulas secretoras oleíferas de los frutos que contienen esencias muy aromáticas (21). El limón es de origen híbrido, donde probablemente el padre sea un cidrón con cruce con alguna planta desconocida. El cruce de cepas de limones da descendencia con características de los arboles tales como el *Citrus jambhiri* Lush., que es un híbrido entre *Citrus médica* y *Citrus reticulata*, esta especie es a menudo utilizado como patrón resistente para otros cítricos, se caracteriza por su corteza áspera y rugosa (38).

- Reino: Plantae
 - División: Angiospermas (Magnoliophyta)
 - Clase: Dicotiledoneas (Magnoliopsida)
 - Subclase: Rosídeas (Rosidae)
 - Orden: Terebintales o Sapindales
 - Familia: Rutaceae
 - Subfamilia: Auranzioideas (Citroideae)
 - Tribu: Citreae
 - Genero. Citrus
 - Especie: *C. jambhiri*

2.4.1.2. Descripción morfológica

El árbol es alto y muy ramificado, provisto de abundantes espinas. Los frutos son de morfología diversa, pero en general presentan un cuello en corona y un mamelón apical con aureola ligeramente deprimida, de cáscara dura, rugosa y aromática, la pulpa es escasa y acida, estas características son más evidentes en los frutos maduros, el color varía de acuerdo al estado de maduración desde verde (1), verde amarillo (2 y 3) a amarillo (4) (Figura 1) (39).



Fuente: Cítricos Paraguay. Limón rugoso [Fotografías]. Facebook.
<https://web.facebook.com/citricosparaguay>

2.4.1.3. Origen, distribución geográfica y hábitat

La historia de los cítricos es milenaria, se sabe que la mayoría de especies son originarias de regiones subtropicales y tropicales del este de Asia, concretamente de china y el archipiélago malasio (21).

Al día de hoy ninguna de las especies cítricas cultivadas es conocida en estado silvestre, ya que son producto de la selección y domesticación por el hombre desde tiempos antiguos. Las especies cítricas se extendieron por el mundo conforme avanzaban los descubrimientos y conquistas (39).

Se cree que hace 4000 años a. C. el cidro (*Citrus médica*) ya se conocía en Egipto y Mesopotamia. Se sabe con certeza que los griegos conocían el cidro como *Cedrus*. En los testimonios escritos más antiguos de china se encuentran referencias del Kumquat, pomelos y una especie parecida a la mandarina, la que hoy en día es conocida como Cheng Tzu. En otros testimonios también de China, se describen 27 variedades de naranjas dulces, naranjas amargas y mandarinas. 800 años a. C. En la India se describe a los cidros y limoneros como Jambila o Jambira. Teofrasto lo menciona en su libro: "El origen de las plantas". Uno de los primeros en hablar de Cítricos fue Virgilio en las Geórgicas, en donde llama al cidro "fruta de la Media" (21).

TABLA 2: Origen, distribución geográfica y hábitat del género *Citrus*

| HECHOS MAS IMPORTANTES | |
|------------------------|--|
| SIGLO I | Plinio escribe sobre los cítricos en "Historia natural".
El cidro es el primer citrus conocido en Europa, llevado por los soldados de Alejandro, el cual fue utilizado por su aroma y como repelente de polillas. |
| SIGLO III | El limón llega a Europa, este nombre actual deriva de la palabra <i>limum</i> , un término introducido, por los árabes. |
| SIGLO VIII | En Japón se encontró referencias de los cítricos que describían el cultivo y sus usos, en los escritos Kojiki y Nihon Shoko. |
| SIGLO IX-X | La naranja agria es conocida en Europa, naranja deriva del termino árabe <i>nareng</i> . |
| SIGLO XIV | La naranja dulce llega a Italia, desde el cercano Oriente, y a Portugal desde la India. |
| SIGLO XVI | En el continente americano, estas plantas empiezan a difundirse, en Florida y más tarde en California. |
| SIGLO XVIII | Linneo define el género <i>Citrus</i> en su texto fundamental "Species plantarum".
Los cítricos se han difundido ya por todos los países islámicos |
| ACTUALIDAD | Los cítricos se difunden en el mediterráneo, las costas Asiáticas, África y las zonas de Europa y varias zonas de América, como México, Florida y Brasil. |

Adaptado de Aldo Colombo "Cultivar cítricos ornamentales y de fruto" (21) y Jorge León "Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales" (39)

2.4.1.4. Aspectos bioquímicos y composición química

El extracto obtenido por agitación con solución metanólica de la cáscara del limón rugoso proveniente de Huánuco-Perú reporto presencia de polifenoles equivalentes a 1.42 ± 0.03 gramos equivalentes a ácido gálico por 100 gramos de muestra (30).

El aceite esencial de la cáscara de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), presenta variaciones en su composición dependiendo de las zonas geográficas de las que proceden; sin embargo, el limoneno está posicionado como el principal componente (40, 41).

En frutos cultivados en nuestra región el aceite esencial de la cascara presenta la siguiente composición: linalool con 4.1%; citronelal con 4.9%; E- β -ocimeno con 5.6 %; β -pineno con 25.1% y el limoneno con 37.7%. En menor concentración se encuentran α -pineno, mirceno, α -terpineno, Z- β -ocimeno, γ -terpineno, geranial, terpinen-4-ol, eugenol neral, β -cariofileno y acetato de citronelila (34).

2.4.1.5. Usos tradicionales y medicinales

Citrus jambhiri Lush. al ser un híbrido resultante del Cidro, ha sido valorado principalmente por su aroma, y es utilizado como patrón para injertar gracias a su resistencia al virus tristeza de los cítricos y su adaptabilidad en suelos arenosos, profundos, salinos y en temporadas de sequía (39, 40).

En una encuesta realizada en el país vecino de Ecuador el año 2023, los encuestados refirieron utilizar los limones, incluido el limón rugoso, en jugos, curtidos, desinfección de herramientas, infusiones, y la corteza como saborizante (42). Del uso tradicional en nuestro país no se encontró referencias documentales; sin embargo, los dueños del predio donde se recolectó la muestra para este estudio, refirieron comer directamente la fruta madura, utilizar el zumo del fruto verde para hacer refrescos, infusiones para el resfriado, agregarlo en ensaladas y como repelente contra los mosquitos frotando el fruto partido por la mitad en rostro, brazos y pies.

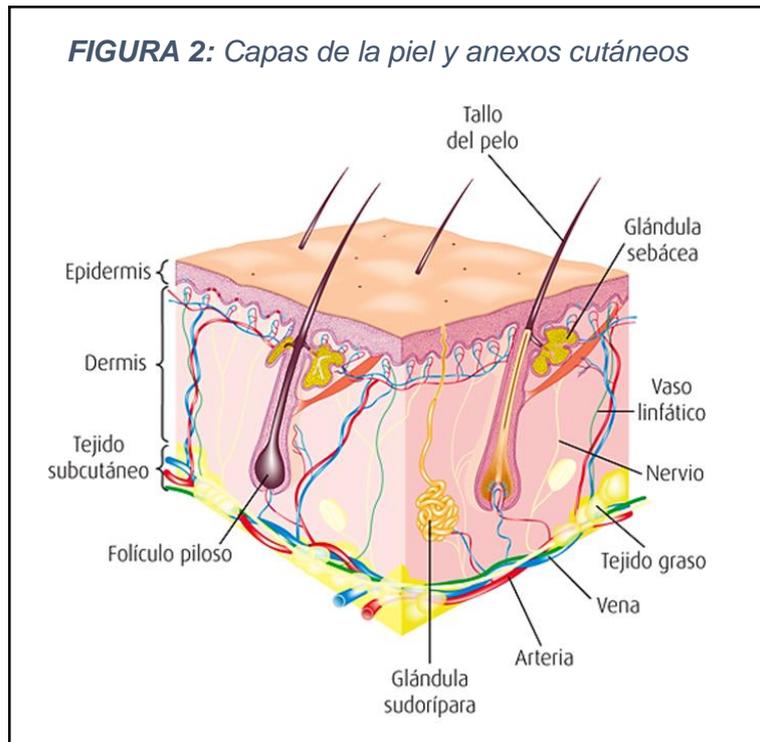
2.4.2. Piel y melanogénesis

2.4.2.1. Anatomía y fisiología de la piel

La piel es uno de los órganos más importantes, en primer lugar debido a su tamaño, en un individuo promedio abarca alrededor del 6% de su peso corporal y tiene un espesor de 2.2 mm en promedio y segundo debido a las diferentes funciones que cumple, como es proteger al organismo del ambiente externo y facilitar la comunicación con el mismo, evitar la pérdida de fluidos corporales, protección de los rayos UV, microorganismos y tóxicos, síntesis de vitamina D, termorregulación, excreción de sustancias a través de las glándulas, transmisión de la información sensorial, la mecanorecepción, en otras, todo ello gracias a los diferentes constituyentes celulares y a los anexos cutáneos (43,44).

Estructuralmente la piel está conformada por 3 capas superpuestas (Figura 2):

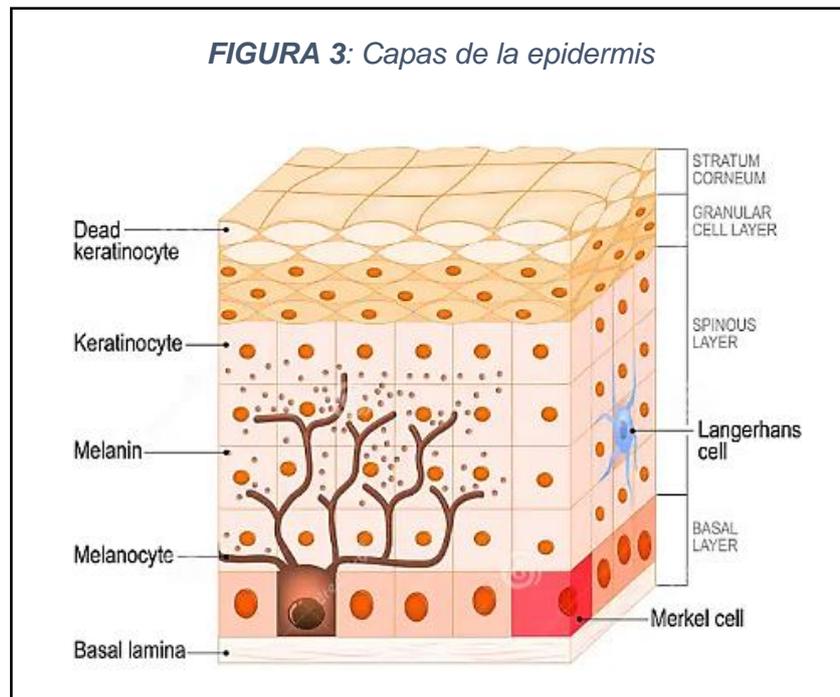
1. Epidermis.- Es la capa más externa, de característica avascular, conformada por un epitelio plano poliestratificado y queratinizado, los tipos celulares más frecuentes son los queratinocitos, los melanocitos, células de Langerhans y las células de Merkel,
2. La dermis.- La capa intermedia, también conocida como Corión, es vascularizada y está conformada por tejido conectivo con gran cantidad de fibras de colágeno y elastina producidas por los fibroblastos, ahí se encuentran las células de Merkel y los anexos cutáneos, esta capa está dividida en dermis papilar y dermis reticular,
3. Hipodermis.- Es la capa más interna, conocida como tejido subcutáneo, es el nexo de unión con los órganos internos, está constituida por tejido conectivo laxo, donde predominan los adipocitos (43, 44, 45, 46).



Fuente: Julío Sepúlveda Saavedra: Texto Atlas de Histología. Biología Celular y Tisular (44).

2.4.2.1.1. Epidermis

La epidermis es la capa más superficial, cuenta con la mayor cantidad de células y una dinámica de recambio excepcional, predominan los queratinocitos en fases progresivas de diferenciación que se desplazan de adentro hacia afuera, conformando los 4 estratos: estrato corneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal (43) (Figura 3).



Fuente: Daniela Estrada: Desarrollo del Sistema Tegumentario (47).

a. Estrato corneo

Es el estrato más superficial y más ancho de la epidermis, que además es el más variante en grosor. Constituye la primera línea de defensa de la piel, con una función barrera frente a agresiones del medio externo. Está formada por entre 20 a 30 capas corneocitos (células muertas, aplanadas, escamosas y sin núcleo). En este estrato se diferencian 2 subcapas, la capa cornea compacta (la más profunda, es densa y cohesiva) y una capa laxa (la menos cohesiva que al hacerse más externa se descamará) (43).

b. Estrato lucido

Selectivamente están presentes en la palma de los pies y de las manos, poseen de 2-3 capas de queratinocitos diáfanos que carecen de núcleo, aplanados y con el citoplasma lleno de eleidina, precursor de la queratina. Tiene la función principal de evitar la salida o entrada de agua (43).

c. Estrato granuloso

Este estrato está conformado por 3-5 capas de células romboidales aplanadas, en forma de diamante y toscamente granular (queratobialina y gránulos lamelares), es aquí donde inicia el proceso de queratinización. Los gránulos lamelares vierten hacia el espacio extracelular una especie de pegamento que está constituida por glicolípidos, fosfolípidos y ceramidas que mantiene las células unidas y forman la probarrera lipídica (43).

d. Estrato espinoso o de Malphigio

Está constituido por 8-10 capas de células espinosas irregulares y poliédricas, que están unidas por proyecciones citoplasmáticas y con puentes intercelulares (desmosomas). En este estrato se encuentran también las células dendríticas (43).

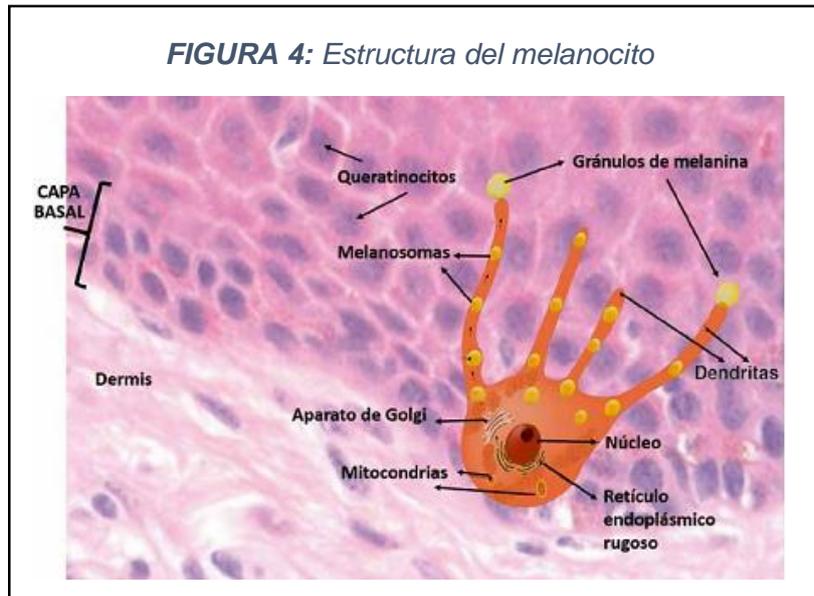
e. Capa basal o estrato germinativo

Es la capa más profunda de la epidermis, está separada de la dermis por la lámina basal y anclada a la misma por hemidesmosomas. Es una capa monoestratificada de células cubicas o cilíndricas, con un núcleo grande. En esta capa se encuentran las células madre indiferenciadas, células postmitóticas, células comprometidas, células de Merkel, con función sensorial y los melanocitos (43).

2.4.2.2. Melanocitogénesis

Los melanocitos son células dendríticas (Figura 4) que se originan en la cresta neural, un grupo de células ubicadas a nivel del tubo neural, específicamente los melanoblastos, estos migrarán a diferentes tejidos como, la piel, los ojos, leptomeninge y los folículos pilosos una vez que se cierra el tubo neural. Todo este proceso de migración de los melanocitos, para que lleguen a su respectivo sitio, requiere de estímulos por parte de una serie de mediadores, entre ellos el ligando KIT o factor de células madre (SCF), que se unirá a su receptor KIT, el que a su vez está acoplado a tirosina quinasa, conllevando a la autofosforilación de la misma, y llevando a cabo una serie de respuestas celulares que generará la expresión del factor de transcripción inductor de melanocitos (MITF), que a su vez estimulará la melanogénesis, la diferenciación, proliferación y supervivencia de los melanocitos. Otros mediadores son el WNT, la endotelina 3 y el

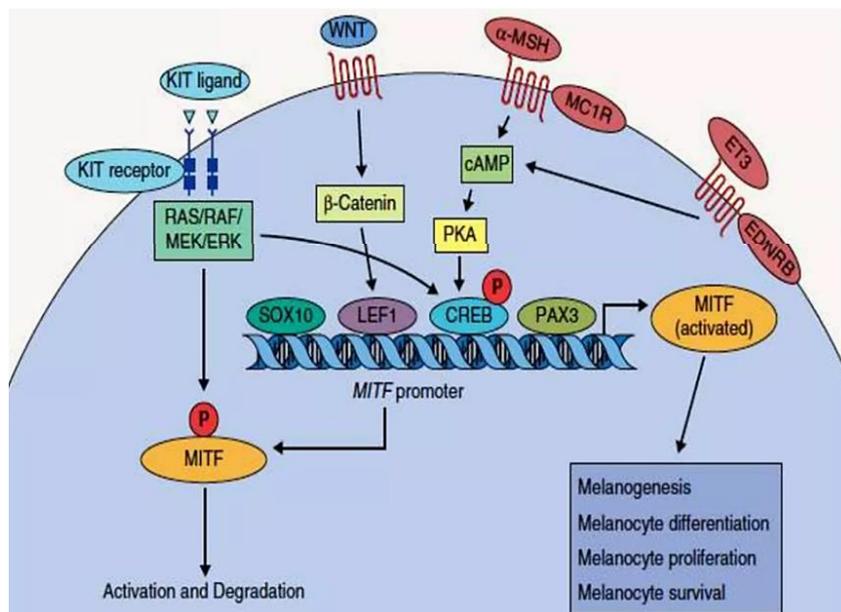
MSH- α que se une al receptor de melanocortina I, que por medio del segundo mensajero AMP cíclico activara el MITF (Figura 5) (43,45,46,48).



Fuente: García Dorado, P. Alonso Fraile: anatomía y Fisiología de la piel (43).

Una vez finalizado todo el proceso de migración, los melanocitos estarán ubicados en sus respectivos sitios. En la piel, están ubicados en la epidermis, a nivel del estrato basal y emiten una serie de prolongaciones o dendritas hacia los queratinocitos, es a través de estas dendritas por las que los queratinocitos adquirirán la melanina que protege el ADN de los rayos UV y es producida en los melanosomas (48).

FIGURA 5: Vías de transducción de señales y factores de transcripción que contribuyen a la diferenciación de melanocitos



Fuente: Bologna J., Schaffer J. y Cerroni L. Dermatology (48).

2.4.2.3. Melanogénesis

La síntesis de melanina ocurre en los melanosomas, organelas celulares semejantes a los lisosomas, es aquí donde se dará la síntesis, depósito y transporte de la melanina. Hay 4 estadios en el desarrollo de los melanosomas (Figura 6):

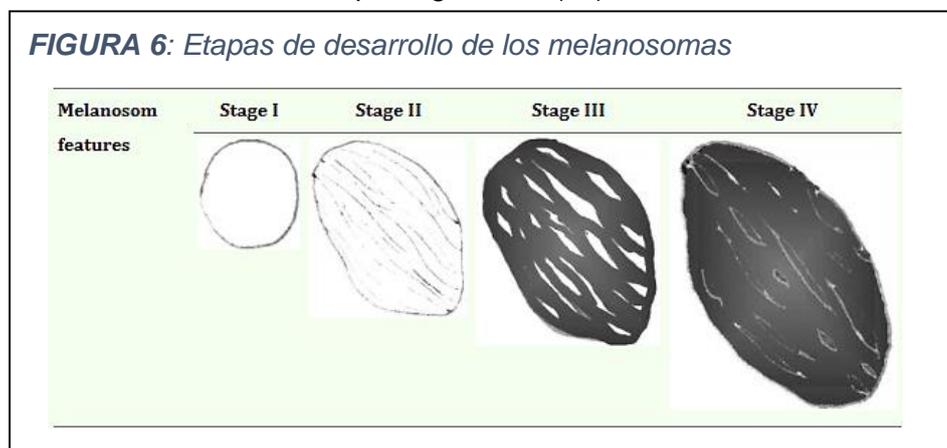
Estadio I (premelanosomas): son vesículas redondas pequeñas que tienen una matriz fibrilar amorfa, no hay depósito de melanina (48,49).

Estadio II: Los melanosomas tienen una forma oval y una matriz fibrilar estructurada constituida por glicoproteínas (PMEL17, MART-1), la tirosinasa está presente y tienen una actividad alta, pero no se ha iniciado la síntesis de melanina, para la maduración de los melanosomas es necesario que aumente el pH intramelanosómico de 5 a 6.8 el cual depende la proteína "P" que actúa como bomba de protones (48,49).

Estadio III: Los melanosomas tienen una forma oval, es aquí donde inicia la producción de melanina, la actividad de la tirosinasa es alta, el melanosoma polimeriza y deposita la melanina en las proteínas fibrilares (48,49).

Estadio IV: El melanosoma es de forma oval, se pierde la actividad enzimática de la tirosinasa, hay un gran depósito de melanina que es transportado a los queratinocitos circundantes a través de los elementos del citoesqueleto (48,49).

Conforme el melanosoma va migrando de la región perinuclear hacia las dendritas de los melanocitos, requiere de las proteínas kinesina y dineina. Una vez en la membrana se debe unir a esta, para ello será necesaria el complejo miosina Va, Rab27a, melanofilina y finalmente la transferencia de la melanina de las dendritas a los queratinocitos se llevará a cabo por fagocitosis (48).



Fuente: Cichorek M., Wachulska M., Staciewicz A., y Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development (49).

La melanogénesis es una serie de reacciones enzimáticas que ocurre en los melanosomas, donde intervienen la tirosinasa, la TRP-1 y la TRP-2, principalmente en los estadios 2 y 3 es donde existe una alta actividad de la enzima tirosinasa, la cual influye sobre la producción de los distintos tipos de melanina, la eumelanina se obtiene por la ruta del dopacromo y la feomelanina se obtiene por incorporación de derivados sulfatados por una vía anabólica (Figura 7). El melanocito en sus dendritas posee gránulos de melanina que tienen confinada a la enzima tirosinasa (28,50).

2.4.3. EFECTO ANTI-TIROSINASA

2.4.3.1. Enzima tirosinasa

Esta enzima está conformada por 519 aminoácidos y puede ser obtenida de múltiples fuentes como: plantas, hongos, bacterias y mamíferos (28).

La tirosinasa es una cuproproteína que cataliza la biosíntesis de los pigmentos de melanina, los cuales determinan la coloración de la piel, el cabello y los ojos, así como el pardeamiento de los alimentos, esta enzima es de gran importancia médica y cosmética, ya que, a diferencia de otras enzimas, esta al enlazarse a dos átomos de Cu a través de los dominios ricos en histidina regula directamente la cantidad de melanina producida (11,27,28).

La sobreexpresión de la enzima tirosinasa puede ocasionar alteraciones en el organismo, como la producción desmedida e innecesaria de melanina, esto a su vez produce desordenes y/o patologías en la pigmentación cutánea, desde simples cuestiones estéticas hasta trastornos clínicos como el melanoma humano (32).

Activación de la tirosinasa: La PKC- β es una proteína quinasa que regula la biosíntesis de melanina, en su forma activada está asociada a la membrana melanosomal en los melanocitos. La fosforilación de tirosinasa parece conducir a la formación de complejos entre tirosina y TRP-1 esto a su vez ocasiona que la tirosinasa sea más estable y por lo tanto aumenta su actividad sobre los melanocitos (28).

2.4.3.2. Inhibición enzimática

2.4.3.2.1. Cinética enzimática

En una reacción espontánea el sustrato pasa a ser producto de forma natural, ocurriendo bajo determinadas condiciones, pero de forma gradual.

En una reacción catalizada por enzimas, la velocidad de conversión del sustrato en producto varía significativamente, la cinética enzimática estudia esta velocidad, la cual se ve afectada por la concentración de sustrato, las propiedades del catalizador (enzima) y la temperatura. Inicialmente la enzima en estado libre [E] se une al sustrato [S] creando una nueva vía de reacción [ES] (51).

Espontaneo



Catalizado



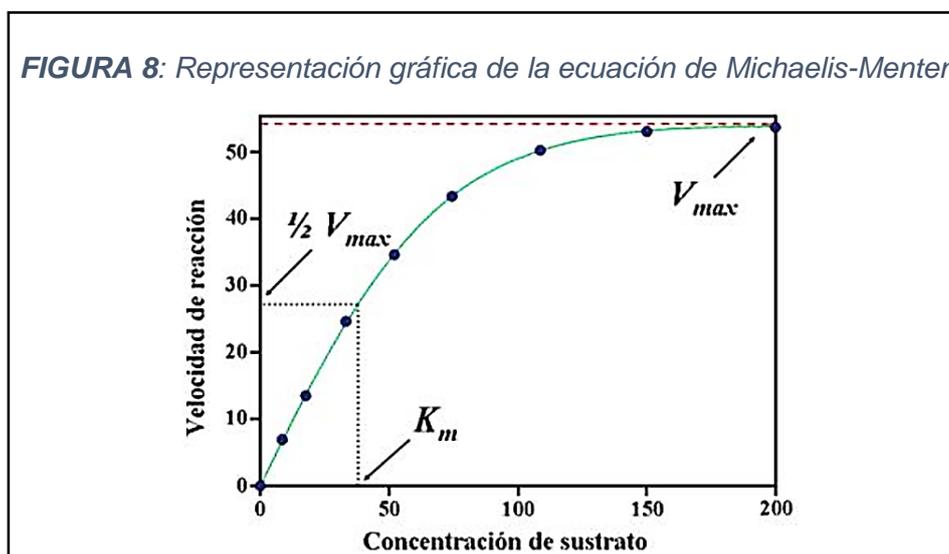
Vinculante Catálisis

La velocidad de esta reacción catalizada por enzimas esta descrita por la ecuación de Michaelis-Menten, donde se relaciona la velocidad inicial (v_1), la concentración de sustrato [S] y 2 parámetros: K_m y V_{max} . Donde:

$$v_1 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

- V_{max} : Es la velocidad máxima que se puede alcanzar a una concentración infinita de sustrato.
- K_m : Es la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la V_{max} .

La constante de Michaelis-Menten " K_m " describe la afinidad de la enzima por el sustrato. Por consiguiente, si la afinidad de la enzima por el sustrato es alta conducirá a un valor de K_m bajo, y viceversa (Figura 8).



Fuente: López J. y García F. Los 4 mosqueteros de la cinética enzimática (51).

2.4.3.2.2. Factores que influyen en la cinética enzimática

Las propiedades catalíticas de las enzimas están influenciadas por diversos factores, los cuales deben optimizarse y controlarse para que al medir su actividad estas sean útiles y reproducibles. Se tiene así:

- Factores físicos como la presión y temperatura.
- Factores químicos de la solución como el pH.
- Concentración de los sustratos, coenzimas, cofactores e inhibidores relevantes.
- El papel de las coenzimas y cofactores es aceptar o donar electrones en una reacción o estabilizar el sustrato durante la reacción por un periodo de tiempo. Dependiendo del tipo de interacción tenemos:
 - 1.- Las coenzimas solubles, que se unen a la enzima durante la reacción, cambian su estructura química, se liberan y con una segunda reacción independiente recuperan su estructura original.
 - 2.- Los grupos prostéticos, son coenzimas que están unidas fuertemente a la enzima durante la reacción, la parte asociada una vez que se libera el primer producto se transfiere a una segunda reacción.
 - 3.- Los iones metálicos, sirven también como cofactores, estabilizan el sitio activo de una enzima, polarizan enlaces químicos dentro del sustrato facilitando la catálisis o participan en reacciones de óxido-reducción.

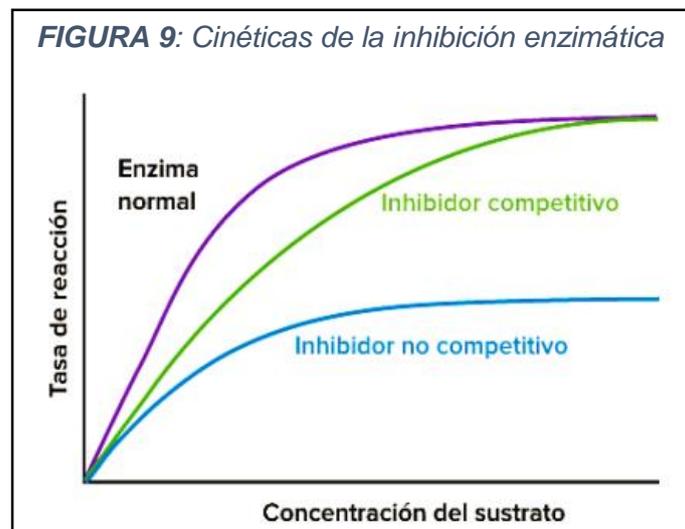
2.4.3.2.3. Cinética de la inhibición enzimática

La inhibición enzimática puede ser reversible o irreversible (Figura 9).

- a. **Inhibición reversible:** De acuerdo a la forma y el lugar de unión a la enzima se clasifica en:
 - Inhibición competitiva. - El inhibidor químicamente tiene una estructura similar al sustrato y ambos compiten por unirse a la enzima, el inhibidor se une a la enzima

en su sitio activo, desplazando al sustrato reversiblemente, disminuyendo así el número de moléculas disponibles de enzima. En la cinética de inhibición competitiva, la reacción podría alcanzar su V_{max} normal, pero se necesita una mayor concentración de sustrato, dicho de otra forma: El V_{max} no varía, pero la K_m aparente es mayor (52).

- Inhibición no competitiva. – El sustrato y el inhibidor pueden estar unidos a la enzima simultáneamente; sin embargo, el inhibidor lo hace en otro sitio de la enzima, evitando así la acción catalizadora de la enzima, disminuyendo el número de moléculas funcionales de la enzima. En la cinética de inhibición no competitiva, la reacción no puede alcanzar su V_{max} sin importar cuanto sustrato se agregue (52).
- b. **Inhibición irreversible:** El inhibidor se une a la enzima en cualquier sitio, mediante enlaces covalentes, de forma irreversible.



Fuente: Khan Academy. Fundamentos de las gráficas de Cinética Enzimática (52).

2.4.3.3. Inhibidores de la enzima tirosinasa

Los inhibidores de la tirosinasa tienen un buen potencial tanto dermatológico, como en el procesamiento de alimentos, por lo que pueden ser clínicamente útiles para el tratamiento de algunos trastornos dermatológicos asociados a la hipermelanosis (27).

A. Fármacos despigmentantes

Dentro de los fármacos con propiedad aclaradora de la piel, están en primer lugar la hidroquinona, que disminuye la hipermelanosis de distintas formas, que se explican a continuación: 1.- Inhibe la tirosinasa a través de los enlaces covalentes de la histidina, 2.- Interacciona con el cobre del sitio activo, 3.- Inhibe la síntesis de ADN y ARN, 4.- Altera la estructura, formación y funciones del melanosoma, 5.- Induce efectos necróticos sobre el melanocito y 6.- Disipa la formación de glutatión de las especies reactivas de oxígeno, compitiendo por la oxidación de la enzima tirosinasa en los melanocitos. Sus dosis se limitan generalmente a concentraciones del 2% debido a su citotoxicidad y efectos colaterales como la hipomelanosis perenne o amelanosis. Otros fármacos de uso limitado debido a sus desventajas son la arbutina que es usado al 1%, el ácido kójico usado en 1-3% y la L-mimosina (11,28).

B. Inhibidores naturales

- 1) **Inhibidores de la tirosinasa aislados a partir de hongos:** 1.- El *ácido azelaico* es producido por la acción de la levadura *Pityrosporum ovale*, que lipoperoxida los ácidos grasos libres y cis-esterificados, este compuesto inhibe competitivamente a la tirosina, se une a los grupos aminos o carboxílicos del sitio activo de la enzima, interfiere en la síntesis de ADN y en la actividad de las mitocondrias de los melanocitos hiperactivos y anormales. 2.- El *ácido kójico* es producido por el metabolismo de varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, inhibe la tirosinasa quelando el Cu del sitio activo de la enzima. 3.- La *metalotioneina* proviene del *Aspergillus niger*, queela el cobre en el sitio activo de la tirosinasa. 4.- La *agaritina* procedente de *Agaricus bisporus*, inhibe competitivamente la L-tirosina y no competitivamente la L-DOPA (11).
- 2) **Polifenoles:** Estos compuestos son conocidos como sustratos de tirosinasa, son metabolitos secundarios producidos por la mayoría de especies vegetales, de las cuales se han aislado el kaempferol, quercetina, kurarinona y kushnol, estos inhibidores potentes quelan el cobre en el sitio activo de la enzima. Un grupo de interés son los flavonoides que potencian la actividad anti-tirosinasa, esto puede explicarse debido a que poseen un grupo α -ceto que tiene similitud con los grupos dihidroxifenilos del L-DOPA; además, los flavonoides captan radicales libres, evitando la peroxidación de los lípidos por acción de la radiación UV. Otros compuestos de importancia son los galatos, como el ácido gálico, que evita la oxidación de la L-DOPA y puede actuar como sustrato al oxidarse antes que la L-DOPA (11,28).
- 3) **Aldehídos y compuestos relacionados:** Su mecanismo de acción puede sustentarse debido a que forman una base de schiff con un grupo amino primario de la enzima, entre los más importantes están: anisaldehído, (2E)-alquenales, transcinamaldehído, el ácido cúmico, 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído, el ácido 3,4-dihidroxicinámico, cuminaldehído y el ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (11).

Otros compuestos aislados de fuentes naturales son los triterpenos pentacíclicos y derivados de *N-trans-feruloiltiramina* (11).

C. Inhibidores de origen sintético

Entre los inhibidores de origen sintético se tiene: 1.- Rucinol: Es un derivado del resorcinol que posee alta tolerancia y carece de citotoxicidad, la concentración recomendada es de 0.3% (28). 2.- La Hidroxilamina, los tioles, los ácidos aromáticos carboxílicos, la N-ciclopentil-N-nitrosohidroxilamina, son compuestos donde los grupos nitroso o hidroxilo interaccionan con el cobre del sitio activo inhibiendo la enzima. 3.- La cisteína y los ácidos carboxílicos aromáticos inhiben de forma no competitiva, competitiva, mixta o acompetitivamente dependiendo del método usado o de la naturaleza que tenga el inhibidor. Otro grupo de compuestos conocidos como inhibidores de acoplamiento lento son la tropolona y el ácido *m*-cumarico (11).

2.4.4. EFECTO ANTIOXIDANTE

2.4.4.1. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas producto del metabolismo celular, se caracterizan por que en el orbital externo de su estructura atómica tienen un electrón desapareado, lo que le otorga una alta inestabilidad, reactividad y vida efímera. Estas moléculas tienen

la capacidad de reaccionar inespecíficamente con diversas moléculas que conforman la célula, por ejemplo los carbohidratos, las proteínas, los lípidos, los ácidos nucleicos y derivados de todos ellos (53).

2.4.4.2. Antioxidantes

Los antioxidantes pueden impedir o retrasar la oxidación e incluso mitigar los efectos perjudiciales producidos por los radicales libres (54). Los compuestos antioxidantes se clasifican en dos grandes grupos:

- **Antioxidantes enzimáticos.** – En este grupo están las enzimas primarias (glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) y secundarias (glucosa-fosfato-deshidrogenasa y glutatión reductasa), estas enzimas apoyan a los demás antioxidantes endógenos (54, 55).

- **Antioxidantes no enzimáticos.** – Son obtenidas de las fuentes dietéticas, están los polifenoles (ácidos fenólicos y flavonoides), las vitaminas, los carotenoides, los minerales y los organosulfurados (54, 55).

2.4.4.3. Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante

▪ **Método DPPH**

Este método es muy usado para determinar la capacidad antioxidante de muestras vegetales, está basado en el viraje de coloración de un violeta intenso a una coloración amarilla, químicamente esta viraje de color se da gracias a la aceptación de un electrón o átomo de hidrógeno por la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazina en solución metanólica de una solución antioxidante, el cambio en la coloración es un indicador de actividad antioxidante, el cual se puede medir en el espectrofotómetro a 517nm (56).

▪ **Método ABTS**

El catión radical ABTS⁺ es generado químicamente por la interacción del reactivo ABTS con persulfato potásico, manifestándose así una coloración verde-azulada intensa, que al reaccionar con compuestos antioxidantes disminuye la intensidad del color. Este método tiene muchas ventajas, ya que además de que el catión radical es soluble en medios apolares y polares, evalúa antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, no es afectado por la fuerza iónica y es el método más indicado en muestras coloreadas, reduciendo las posibilidades de interferencias (56).

2.4.5. Metabolitos secundarios: extracción e identificación

A. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS.

- Procesos de extracción sólido-líquido:

Método ampliamente utilizado, se aplica para recuperar compuestos bioactivos retenidos en la matriz de productos naturales, como plantas y microorganismos, cumple un importante papel en la separación de compuestos fenólicos. Los solventes más utilizados son el metanol, etanol, acetato de etilo, acetona y mezclas. Las técnicas tradicionales incluyen, la maceración, la percolación, la extracción por Soxhlet, etc., las desventajas son el tiempo de extracción y las cantidades de solvente empleadas (57).

- Tecnologías no convencionales:

Estas técnicas tienen gran potencial para extraer eficientemente, sostenible y económicamente, moléculas bioactivas presentes en los tejidos vegetales; y están basados principalmente en la transferencia de materia entre distintas fases del sistema por acción del calor, su desventaja es provocar degradación en compuestos termolábiles, dentro de las principales técnicas están, la extracción asistida por microondas, con ultrasonidos de potencia, los fluidos supercríticos, la extracción acelerada con disolventes presurizados, etc. (57).

B. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN FITOQUÍMICA

Las pruebas de identificación fitoquímica, son un conjunto de métodos que posibilitan la detección de los distintos constituyentes químicos en muestras vegetales, están basados en el empleo de pruebas colorimétricas precedida de una extracción con un solvente apropiado. Dentro de los métodos y reactivos estandarizados para la identificación de los principales metabolitos secundarios están el ensayo de Shinoda para identificar flavonoides, ensayo de Fehling para azúcares reductores, ensayo de Liebermann-Burchard para lactonas sesquiterpénicas, ensayo de gelatina para la identificación de taninos, ensayo de espuma para saponinas, tricloruro férrico para la identificación de compuestos fenólicos, el reactivo Borntrager para la identificación de Quinonas y el reactivo Dragendorff para la identificación de alcaloides. (58).

2.4.6. Compuestos fenólicos: Clasificación y cuantificación

Los compuestos fenólicos son uno de los principales metabolitos secundarios presente en los vegetales, donde desempeñan diversas funciones biológicas (59). Químicamente poseen en común un anillo aromático que tiene entre uno o más sustituyentes hidroxilos, son solubles en agua ya que tienen una característica relativamente polar, al ser agregadas con una solución alcohólica o acuosa al 1% de tricloruro de hierro manifiestan un intenso color verde, púrpura, azul o negro (58). La actividad antioxidante de los polifenoles es gracias a su capacidad para inhibir la enzima lipooxigenasa, atrapar radicales libres y quelar metales (59).

2.4.6.1. Clasificación de los polifenoles y ejemplos

TABLA 4: Clasificación de los polifenoles ejemplos.

| TIPO | CARACTERÍSTICA | EJEMPLO |
|------------------------------|--|--|
| FLAVONOIDES
(antotaxinas) | Contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico ($C_6C_3C_6$), se encuentran en forma de glicósidos con 1 o 3 unidades de azúcar. | Quercetina
Naringenina
Hesperetina |
| CUMARINAS | Tienen como núcleo la cumarina, se encuentran como mezclas, en forma libre o como glicósidos. | Angelicina
Dicumarol |
| CROMENOS Y
BENZOFURANOS | Son biogenéticamente formados por combinación de una unidad de isopreno y un sistema fenólico. | Encecalin
Euparina
Dihidroeuparina |
| XANTONAS | Pigmentos fenólicos amarillos, presentan similitud con los flavonoides en movimientos cromatográficos. | Gentiseína
Mangiferina
Swertianina |
| QUINONAS | Compuestos cuya coloración varía desde el amarillo pálido hasta casi negro. | Naftoquinona
Alizarina |

Adaptado de Lock. Investigación fitoquímica (58).

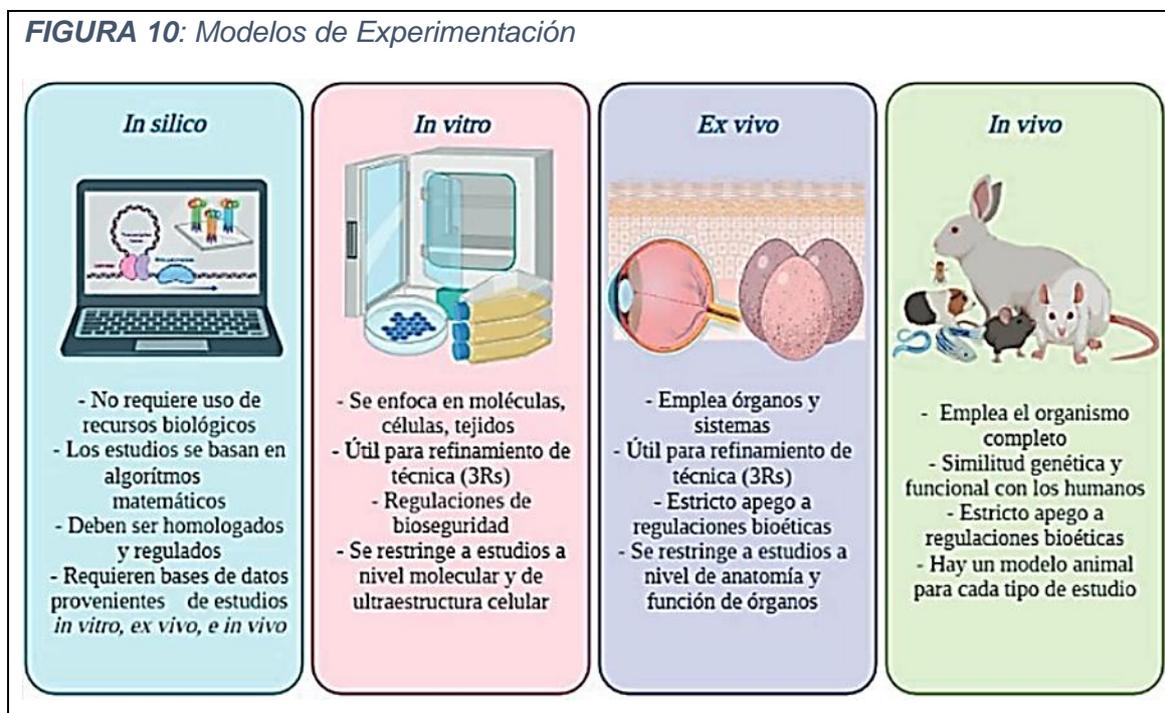
2.4.6.2. Cuantificación de polifenoles: MÉTODO Folin-Ciocalteu

Este método es utilizado para cuantificar los compuestos fenólicos presentes en tejidos vegetales, utiliza el reactivo del mismo nombre (reactivo Folin-Ciocalteu) que está compuesto por molibdato sódico y wolframato sódico en ácido fosfórico que dan lugar al ácido fosfomolibdotungstico de color amarillo. Este método está basado en que a pH básico, mediante reacción redox, el reactivo reduce los grupos fenólicos, dando lugar a una coloración azul, la cual puede determinarse espectrofotométricamente a 765 nm en función a una recta patrón elaborado con ácido gálico (59).

2.4.7. Modelos experimentales utilizados en investigación biomédica

La producción de conocimiento científico se sustenta en el uso de diferentes técnicas y protocolos que han favorecido la creación o selección de modelos biológicos para la experimentación, o la investigación observacional. Existen diversos modelos de estudio, en la clasificación general, como son los modelos experimentales: *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Figura 10) (60).

FIGURA 10: Modelos de Experimentación



Fuente: Barrientos Bonilla, A. A., Zavala Flores, L. M., & Hernández Baltazar, D. Modelos Biológicos en investigación biomédica: características e implicaciones (60).

2.5. Marco conceptual

- **Antioxidante:** Capacidad de algunos compuestos para evitar la degradación oxidativa, actúa gracias a su habilidad para reaccionar con los radicales libres (55).
- **Hiper melanosis.** Lesiones de color marrón, negruzcas o azul oscuras, que histológicamente la epidermis o dermis posee un exceso de melanina y/o melanocitos (2).
- ***In vitro*:** Tipo de ensayo donde los experimentos se llevan a cabo en dispositivos de laboratorio utilizando moléculas, células o tejidos provenientes de especies animales (61).

- **Melanina:** Son un conjunto de moléculas que poseen diferentes grados de polimerización y oxidación, se forman a partir de la tirosina y se clasifican en eumelaninas y feomelaninas (50).
- **Melanodermias:** Intensificaciones en la coloración de la piel principalmente debido a excesiva melanina, causada por el aumento en la producción de este pigmento o el tamaño de los melanosomas (8).
- **Melanoma:** Es una neoplasia maligna que se desarrolla en las células productoras de melanina (melanocitos), se caracteriza porque después de la transformación maligna estas células expresan muchas moléculas de señalización, factores que promueven la migración y la metástasis (19).
- **Radicales libres:** Son átomos que tienen un electrón desapareado, lo que les confiere mucha reactividad, haciéndolos más propensos a captar un electrón de otros átomos para poder alcanzar su estabilidad electroquímica (62).
- **Tirosinasa:** Es una metaloenzima que interviene en la formación de pigmentos melánicos, es responsable de anomalías en la pigmentación de la piel (63).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

a. Material botánico

Muestra vegetal: Epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso).

b. Materiales e instrumentos de laboratorio

b.1 Material de campo

- Baldes oscuros Reyplast
- Papel kraft
- Cámara fotográfica

b.2 Materiales de vidrio

- Tubos de ensayo de 10 mL y 20 mL
- Vasos de precipitado de 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 mL
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Baguetas
- Probetas de 10, 20 y 50 mL
- Frasco de vidrio de 3L de capacidad
- Embudo de vidrio LBY Germany
- Matraz de 250 y 1000 mL
- Fiolas de 10, 25, 100 y 250 mL
- Cubetas de 3.5 mL para espectrofotómetro

b.3 Instrumentos

- Gradillas
- Pizetas
- Mortero
- Soporte universal
- Papel filtro
- Pinzas
- Micropipeta de 5-50 μ L
- Micropipeta de 100-1000 μ L
- Gasa
- Termómetro
- Rallador de acero inoxidable
- Bandejas de acero inoxidable
- Cocinilla eléctrica
- Baño María
- Placa fondo plano por 96 pocillos descartable
- Cronómetro
- Propipeta
- Puntas para micropipeta de capacidad 0.5-20 μ L

- Puntas para micropipeta de capacidad 2.0 - 200 μ L
- Puntas para micropipeta de capacidad 50-1000 μ L

b.4 Equipos de laboratorio

- Balanza analítica OHAUS PIONEER PA523
- Balanza analítica marca KERN de capacidad 210 g, resolución de 0.1 mg y sensibilidad de 1 mg.
- Espectrofotómetro UV-VIS EVOLUTION 300
- Estufa marca BINDER FD 115
- Refrigeradora marca BOSCH
- Sonicator marca BRANSON 2800
- Ultrapurificador de agua marca THERMO
- Destilador GFL
- Centrifuga niive NF 200
- Espectrofotómetro lector de microplacas ELISA de 96 pocillos EPOCH BIOTEK

b.5 Reactivos y solventes

- Metanol de concentración de 99.8%
- Etanol 96°
- Cloroformo
- Reactivo Fehling A
- Reactivo Fehling B
- Reactivo Bormtrager
- Ácido clorhídrico concentrado
- Cloruro de sodio
- Reactivo Mayer
- Magnesio metálico (cinta)
- Tricloruro férrico al 5% en etanol
- Reactivo Dragendorff.
- Reactivo Liebermann-Burchard

b.6 Reactivos para la determinación de la actividad anti-tirosinasa

- Kit de cribado de inhibidores de la tirosinasa MAK257-Sigma aldrich (64).
 - Tampón de ensayo de tirosinasa
 - Sustrato de tirosinasa
 - Enzima: Tirosinasa
 - Potenciador de tirosinasa
 - Control: Ácido kójico

b.7 Reactivos para la determinación de la actividad antioxidante

- 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (Reactivo DPPH) Sigma aldrich
- 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) Sigma aldrich
- Persulfato de potasio Merck
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) Sigma aldrich

b.8 Reactivos para la cuantificación de Compuestos fenólicos

- Carbonato de sodio
- Ácido gálico
- Reactivo Folin-Ciocalteu

b.9 Otros materiales

- Cuchillos
- Cronometro MARCA CASIO
- Guantes quirúrgicos
- Mascarillas
- Gorros
- Guardapolvo
- Marcador indeleble
- Papel aluminio
- Papel tissue

3.2. Diseño metodológico

3.2.1. Nivel y tipo de investigación

La presente investigación es de tipo experimental con enfoque cuantitativo, porque, se recolectaron los datos para probar la hipótesis con base en la medición numérica y la técnica estadística de regresión lineal.

3.2.2. Diseño de la investigación

La presente investigación corresponde a un diseño cuasi-experimental, porque se manipula la variable independiente: "Fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), para ver su efecto y relación con las variables dependientes: "Actividad anti-tirosinasa in vitro" y "Actividad antioxidante in vitro".

3.2.2.1. Diseño de prueba anti-tirosinasa de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico.

TABLA 5: *Diseño de prueba de la actividad anti-tirosinasa in vitro*

| Grupo | Tratamiento experimental | Medición de la prueba |
|-----------|--------------------------|-----------------------|
| G_1 | X_1 | O_1 |
| G_{2-4} | X_{2-4} | O_{2-4} |
| G_{5-9} | X_{5-9} | O_{5-9} |

Fuente: Elaboración propia

Donde:

G_1 : Pocillo con la solución de buffer

G_{2-4} : Pocillos con ácido kójico y buffer.

G_{5-9} : Pocillos con muestra y buffer.

X_{1-9} : Reacción con la enzima tirosinasa en presencia del sustrato L-tirosina.

O_{1-9} : Observación y medición de la absorbancia correspondiente a la inhibición de la enzima tirosinasa por el control ácido kójico, La muestra y el blanco.

3.2.2.2. Diseño de prueba antioxidante de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico.

TABLA 6: Diseño de prueba de la actividad antioxidante in vitro

| Grupo | Tratamiento experimental | Medición de la prueba |
|-----------|--------------------------|-----------------------|
| G_1 | X_1 | O_1 |
| G_{2-6} | X_{2-6} | O_{2-6} |
| G_{7-9} | X_{7-9} | O_{7-9} |

Fuente. Elaboración propia

Donde:

G_1 : Tubos con la solución de metanol al 80%.

G_{2-6} : Tubos con las diferentes diluciones del control trolox.

G_{7-9} : Tubos con las diferentes diluciones de la muestra en estudio (fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico, elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso).

X_{1-9} : Adición del reactivo DPPH o ABTS.

O_{1-9} : Observación y medición de la absorbancia correspondiente a la inhibición de radicales libres por las diferentes concentraciones de la muestra en estudio, el control trolox y blanco.

3.3. Criterios de inclusión y exclusión

Muestra Vegetal

- **Criterios de inclusión:** Frutos de la especie *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), en estadios de maduración 2 y 3 (coloración verde amarillo), que no presentó daño mecánico, magulladuras e infestación por plagas.

- **Criterios de exclusión:** Se excluyeron otras partes de la planta como hojas, flores, tallos y todos aquellos frutos de *citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) en estadios de maduración 1 y 4 (frutos verdes y frutos amarillos respectivamente), frutos que presentaron evidente daño, contaminación o ataque de plagas.

3.4. Identificación, definición y operacionalización de variables

3.4.1. Variables implicadas

a. VARIABLE INDEPENDIENTE

Fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso)

a) **Definición conceptual.** - Se define como el extracto obtenido por maceración con cloroformo del extracto hidrometanólico seco, el cual fue obtenido por maceración del epicarpio seco y molido del fruto de la especie en estudio, de la cual se comprobará la actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y la actividad antioxidante (57).

b) **Definición operacional**

- **Naturaleza:** cuantitativa

- **Forma de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón
- **Instrumento de medición:** Balanza analítica
- **Unidad de medición:** peso en mg de extracto
- **Procedimiento de medición:** Pesar una determinada cantidad de la muestra en estudio, disolverla en el solvente apropiado (mL) y medir su efecto anti-tirosinasa y la captación de radicales libres.
- **Indicadores:** Cantidad de extracto en solución
- **Expresión final:** µg/mL

b. VARIABLES DEPENDIENTES

Actividad anti-tirosinasa *in vitro*

- a) Definición conceptual.** - Se define como la capacidad de inhibir la actividad de la enzima tirosinasa, una oxidoreductasa que participa en la biosíntesis de melanina, esta enzima cataliza la oxidación de la tirosina en un cromóforo detectable a 510 nm, en presencia de un inhibidor la tasa de oxidación del sustrato disminuye, la cual se determina mediante método espectrofotométrico, utilizando diferentes concentraciones de la muestra en estudio (64).
- b) Definición operacional**
- **Naturaleza:** cuantitativa
 - **Forma de medición:** Indirecta
 - **Escala de medición:** Razón
 - **Instrumento de medición:** Lector de microplacas ELISA
 - **Procedimiento de medición:** Se puso en contacto la enzima tirosinasa y las soluciones de la fracción clorofórmica a diferente concentración, se incubó por 10 minutos a 25°C, se agregó el sustrato L-Tirosina y se realizaron las lecturas a 510 nm en un modelo cinético, cada 10 minutos durante una hora.
 - **Indicador:** Porcentaje de inhibición de la enzima Tirosinasa por la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico de *Citrus jambhiri* Lush.
 - **Expresión final:** IC_{50}

Actividad antioxidante *in vitro*

- a) Definición conceptual.** - Se define como la capacidad de inhibir los radicales libres, evidenciado por el cambio de coloración y medido por método espectrofotométrico, utilizando diferentes concentraciones de la muestra en estudio (56).
- b) Definición operacional**
- **Naturaleza:** cuantitativa
 - **Forma de medición:** Indirecta
 - **Escala de medición:** Razón
 - **Instrumento de medición:** Espectrofotómetro UV-visible
 - **Procedimiento de medición:** Se puso en contacto el reactivo DPPH y ABTS con las soluciones de la fracción clorofórmica a diferentes concentraciones, se incubó la reacción a temperatura ambiente en un ambiente oscuro por 60 y 30 minutos respectivamente y las lecturas se realizaron a 517 nm y 734 nm respectivamente (56).

- **Indicador:** Porcentaje de captación del radical libre DPPH / ABTS por la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico de *Citrus jambhiri* Lush.
- **Expresión final:** IC_{50}

3.4.2. Variables no implicadas

a. VARIABLES INTERVINIENTES

- I. Cuantificación de compuestos fenólicos
 - a) **Definición conceptual.** – Se define como la cantidad de compuestos fenólicos contenido en la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush., evidenciado por el cambio de coloración y medido por método espectrofotométrico (59).
 - b) **Definición operacional**
 - **Naturaleza:** cuantitativa
 - **Forma de medición:** Indirecta
 - **Escala de medición:** Razón
 - **Instrumento de medición:** Espectrofotómetro UV-visible
 - **Procedimiento de medición:** Se puso en contacto el reactivo Folin-Ciocalteu con una solución de concentración conocida de la muestra en estudio a pH básico, se incubó la reacción a 40°C por un periodo de 30 minutos y las lecturas se realizaron a 765 nm (59).
 - **Indicador:** Intensidad de la coloración azul
 - **Expresión final:** Equivalentes gramos de ácido gálico por 1 gramo de muestra. (mg GAE/g FC)
- II. *Especie en estudio*

Muestra vegetal. - Se trabajó con el epicarpio (flavedo) de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush.

Altitud y zona de acopio: 2719 msnm, CC.PP. Toctohuaylla, Distrito Huanquite, Provincia Paruro, Región Cusco.

Estadio de crecimiento: Frutos en estadio de maduración 2 y 3.
- III. Extracción

Solvente y su concentración: metanol 80%

Proporción muestra seca: Solvente: 1:10 (g:mL)

Tipo de extracción: maceración

Tiempo de maceración: 15 días
- IV. Fraccionamiento

Solvente y concentración: Cloroformo grado reactivo

Proporción extracto seco hidrometanólico: Solvente: 1:100 (g/mL)

Método: Maceración

Tiempo de maceración: 15 días

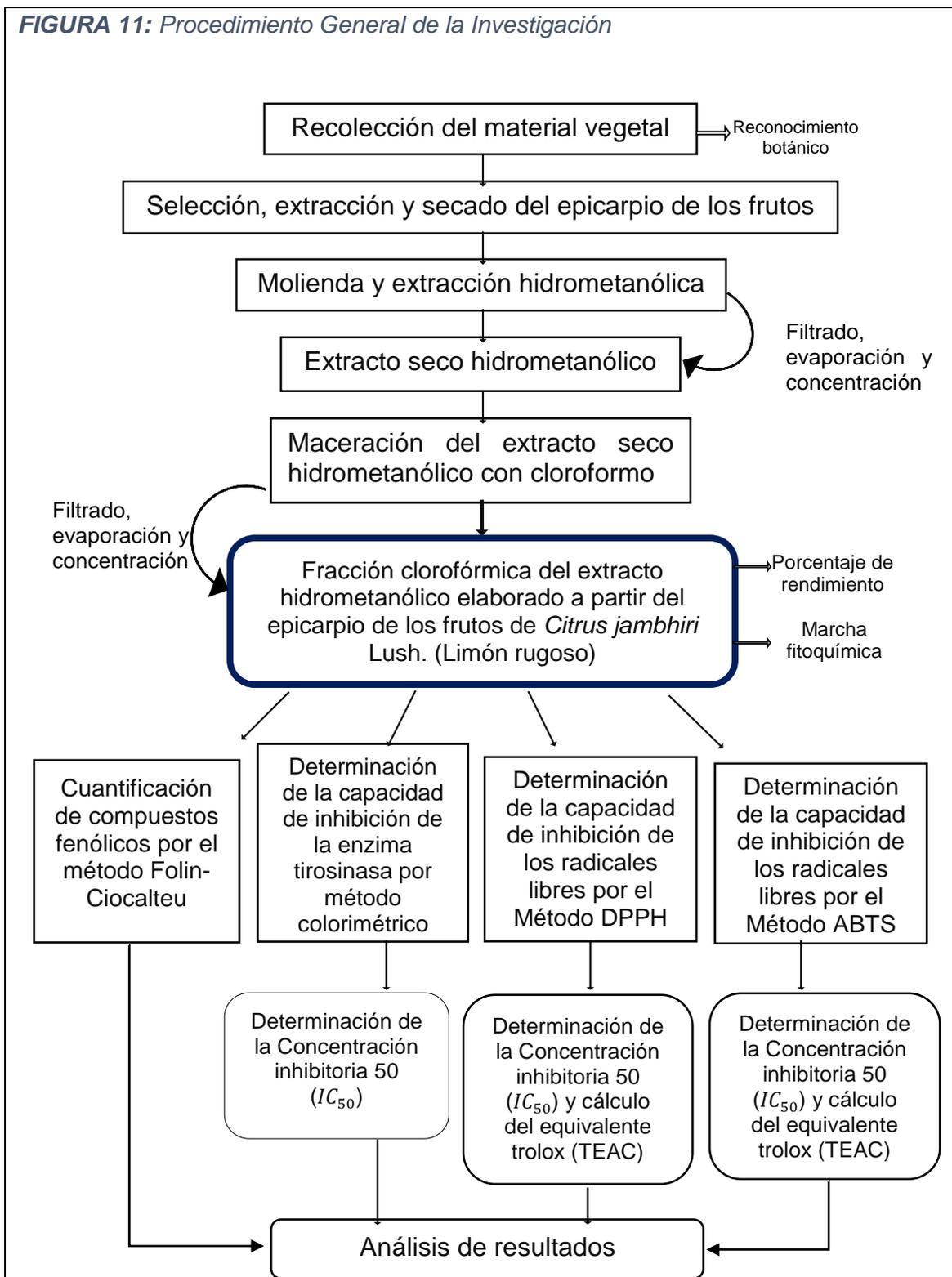
TABLA 7: Cuadro de Operacionalización de variables

| OPERACIONALIZACION DE VARIABLES | | | | | | | | |
|---|--|---|--------------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|--|------------------|
| VARIABLES IMPLICADAS | | | | | | | | |
| VARIABLE INDEPENDIENTE | | | | | | | | |
| Variables | Indicadores | Definición conceptual de los indicadores | Naturaleza del Indicador | Forma de medición | Escala de medición | Instrumento | Procedimiento de medición | Expresión final |
| Fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush. (Limón rugoso). | Cantidad de extracto en solución | Extracto obtenido de la maceración con cloroformo del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush (57). | Cuantitativa | Directa | razón | Balanza analítica | Pesar una determinada cantidad de fracción clorofórmica y disolverla en el solvente apropiado, y medir su efecto sobre la actividad de la enzima tirosinasa y la captación de radicales libres | µg/mL |
| VARIABLES DEPENDIENTES | | | | | | | | |
| Actividad anti-tirosinasa <i>in vitro</i> | Porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa por la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico de <i>Citrus jambhiri</i> Lush. | Se define como la capacidad de inhibir la actividad de la enzima tirosinasa, evidenciado como ausencia de coloración, la cual se determina por espectrofotometría (64). | Cuantitativa | Indirecta | razón | Lector de microplacas ELISA | Poner en contacto la enzima tirosinasa y las soluciones de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush, realizar las lecturas a 510nm en modelo cinético cada 10 minutos por una hora | IC ₅₀ |
| Actividad antioxidante <i>in vitro</i> | Porcentaje de captación del radical libre DPPH/ABTS por la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico de <i>Citrus jambhiri</i> Lush. | Se define como la capacidad de inhibir los radicales libres, evidenciado por el cambio de coloración y medido por método espectrofotométrico (56). | Cuantitativa | Indirecta | razón | Espectrofotómetro UV-visible | Poner en contacto el reactivo DPPH y ABTS con las soluciones de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush., incubar en ambiente oscuro y realizar las lecturas a 517 nm y 734 nm respectivamente. | IC ₅₀ |
| VARIABLES NO IMPLICADAS | | | | | | | | |
| VARIABLES INTERVINIENTES | | | | | | | | |
| Variables | Indicadores | Definición conceptual de los indicadores | Naturaleza del Indicador | Forma de medición | Escala de medición | Instrumento | Procedimiento de medición | Expresión final |
| Cuantificación de compuestos fenólicos | Intensidad de la coloración azul | Cantidad de compuestos fenólicos contenidos en el epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush., detectado por método espectrofotométrico (59). | cuantitativa | Indirecta | razón | Espectrofotómetro UV-visible | Poner en contacto el reactivo Folin-Ciocalteu con una solución de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush., realizar las lecturas a 765nm. | (mg GAE/ 1 g FC) |
| Especie en estudio <i>Citrus jambhiri</i> Lush. | Muestra vegetal: Epicarpio de los frutos de <i>Citrus jambhiri</i> Lush. (Limón rugoso).
Altitud y zona de acopio: 2719 m.s.n.m. Centro poblado Toctohuaylla, Distrito Huanoquite, Provincia Paruro, Región Cusco.
Estadio de crecimiento: Frutos en estado de maduración 2 y 3. | | | | | | | |
| La extracción | Solvente y su concentración (metanol 80%), proporción muestra seca: Solvente (1:10 g:mL), Tipo y tiempo de extracción (maceración por 15 días). | | | | | | | |
| Fraccionamiento | Solvente y su concentración (Cloroformo grado reactivo), proporción extracto seco hidrometanólico: Solvente (1:100 g:mL), Método y tiempo (maceración 15 días). | | | | | | | |

Fuente: Elaboración propia

3.5. Procedimiento de la investigación

Procedimiento general de la investigación (Figura 11)



Fuente: Elaboración propia

3.6. Metodología

3.6.1. Obtención del extracto hidrometanólico

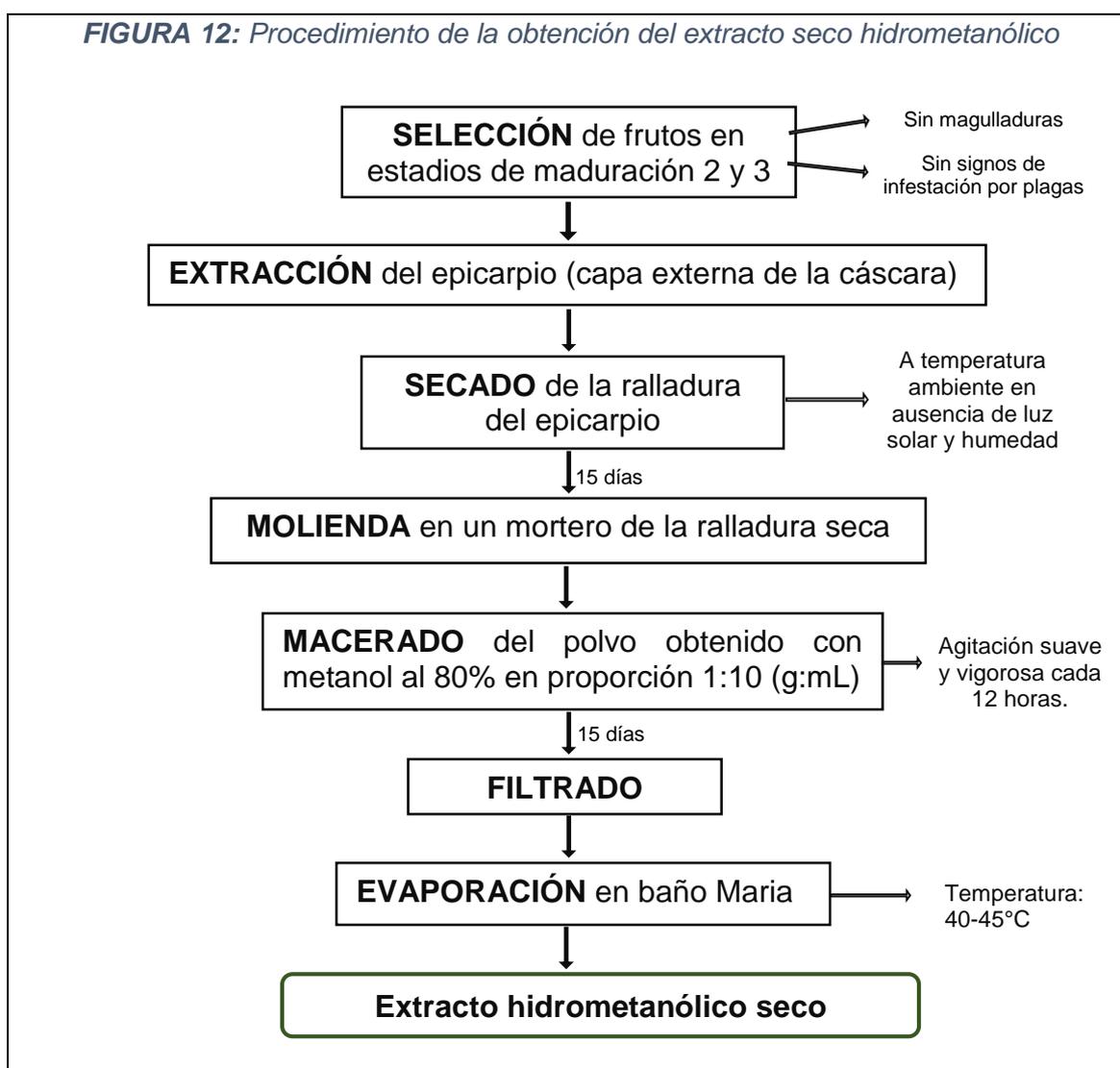
3.6.1.1. Recolección del material vegetal

Los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. fueron recolectados el mes de abril (meses de cosecha en la zona: marzo - Mayo) del año 2023, en el CC.PP. Toctohuaylla del Distrito de Huanquite de la Provincia de Paruro de la región Cusco, a una altura de 2719 m.s.n.m.

3.6.1.2. Reconocimiento, evaluación y clasificación del ejemplar en estudio.

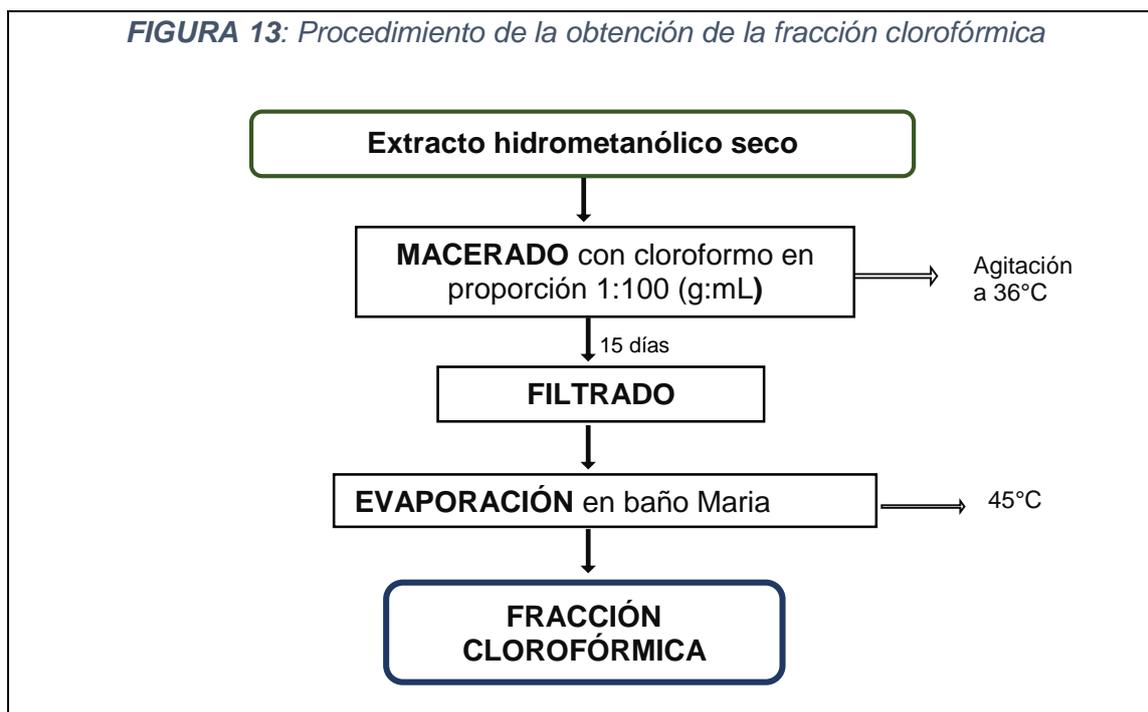
Para tal efecto se llevó al Herbario Vargas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, una muestra representativa del tallo, hojas, y fruto del material vegetal en estudio *Citrus Jambhiri* Lush. (Limón rugoso) (**Anexo 1**).

3.6.1.3. Preparación del extracto hidrometanólico



Fuente: Elaboración propia

3.6.2. Obtención de la fracción clorofórmica.



Fuente: Elaboración propia

3.6.3. Pruebas de identificación fitoquímica en la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico

Para realizar las pruebas de identificación fitoquímica, primeramente, se hizo pruebas de solubilidad, siendo la muestra altamente soluble en etanol de 96°, previamente disolviendo en el solvente elegido se realizó las siguientes pruebas de identificación fitoquímica (Tabla 8).

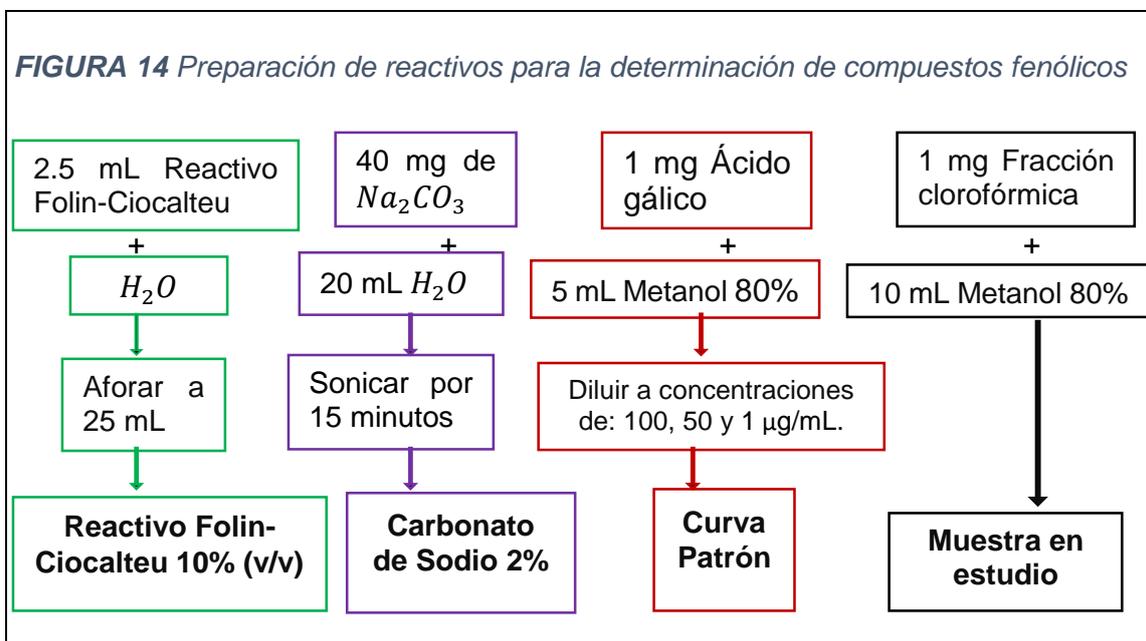
TABLA 8: Pruebas de Identificación Fitoquímica

| METABOLITO SECUNDARIO | REACTIVO |
|------------------------------|-------------------------------|
| Flavonoides | Ensayo de Shinoda |
| Compuestos fenólicos | Tricloruro Férrico $FeCl_3$ |
| Quinonas | Reactivo Borntrager |
| Taninos | Ensayo de gelatina |
| Azúcares reductores | Ensayo de Fehling |
| Lactonas sesquiterpénicas | Ensayo de Liebermann-Burchard |
| Saponinas | Ensayo de espuma |
| Identificación de alcaloides | Reactivo Dragendorff |

Fuente: Adaptado de Lock-Investigación fitoquímica (58) y Sharapin-Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos (65).

3.6.4. Determinación de los compuestos fenólicos totales en la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico, mediante el método Folin-Ciocalteu (59).

- Preparación de los reactivos (Figura 14).



Fuente: Elaboración propia

TABLA 9: Procedimiento para la elaboración de la curva patrón con ácido gálico y determinación de la cantidad de compuestos fenólicos en la muestra en estudio.

| | Blanco | Ácido gálico 1 µg/mL | Ácido gálico 50 µg/mL | Ácido gálico 100 µg/mL | Ácido gálico 200 µg/mL | Muestra 100 µg/mL |
|---|--------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Metanol 80% | 0.5 mL | - | - | - | - | - |
| Extracto | - | - | - | - | - | 0.5 mL |
| Ácido gálico | - | 0.5 mL | 0.5 mL | 0.5 mL | 0.5 mL | - |
| Reactivo Folin-Ciocalteu 10% | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Agitar y dejar reaccionar por cinco minutos a 40°C | | | | | | |
| Na ₂ CO ₃ 2% | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Agitar y dejar reaccionar a 40°C por un periodo de 30 min
Calibrar el espectrofotómetro con metanol al 80% a una longitud de onda de 765 nm
Realizar las lecturas por triplicado a una longitud de onda de 765 nm | | | | | | |

Fuente Elaboración propia

3.6.5. Evaluación de la capacidad inhibitoria sobre la enzima tirosinasa de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico.

Para la evaluación de la capacidad de inhibición de la enzima tirosinasa, se utilizó método colorimétrico. La tirosinasa cataliza la oxidación de la tirosina, produciendo un cromóforo detectable a 510 nm, en presencia de un inhibidor la tasa de oxidación del sustrato disminuye. Todos los reactivos se prepararon de acuerdo a lo descrito en el boletín técnico del Kit de Cribado de Inhibidores de la tirosinasa (**Anexo 9**) (64).

1) **Preparación de la muestra en estudio (fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (limón rugoso))**

Se pesó 3 mg de la muestra en estudio y se disolvió con 3 mL de etanol a 96°, a partir de esta solución madre se preparó diluciones de 500µg/mL, 250µg/mL, 100 µg/mL, 50µg/mL y 25µg/mL (Tabla 10).

TABLA 10: Preparación de las disoluciones de la muestra en estudio

| | Solución madre | Buffer |
|-----------------------------|----------------|---------|
| 500 µg/mL (X ₁) | 10 µL | 10 µL |
| 250 µg/mL (X ₂) | 5 µL | 15 µL |
| 100 µg/mL (X ₃) | 2 µL | 18 µL |
| 50 µg/mL (X ₄) | 1 µL | 19 µL |
| 25 µg/mL (X ₅) | 0.5 µL | 19.5 µL |

Fuente: Elaboración propia

2) **Preparación del ácido kójico**

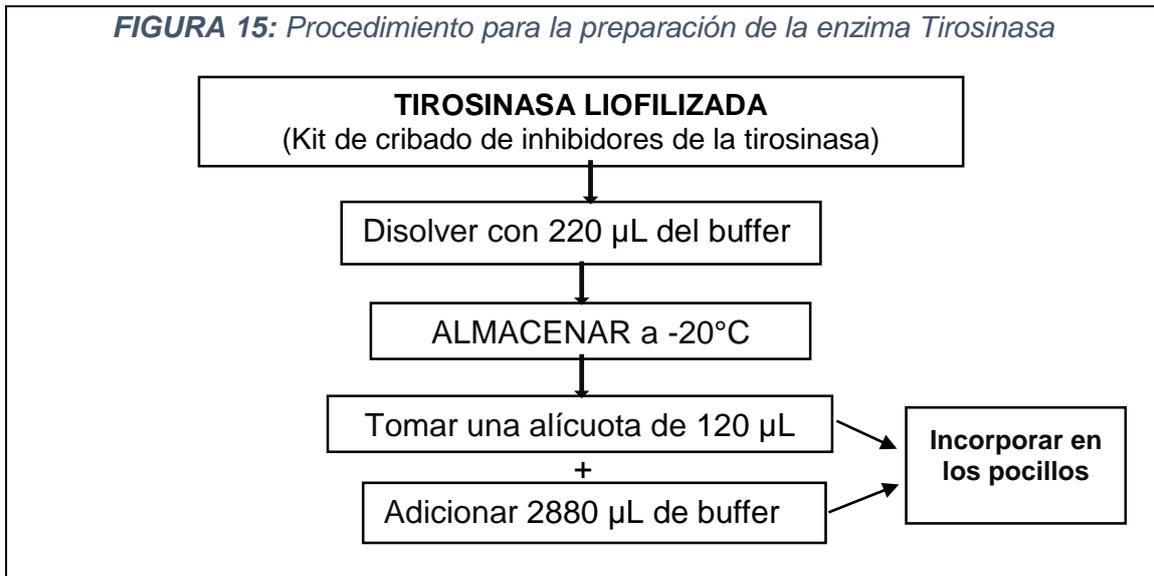
Al vial de ácido Kójico del kit de cribado de inhibidores de la tirosinasa se adiciono 75µL de agua destilada, esta solución madre tiene una concentración de 10 mM, Para la elaboración de la curva patrón se trabajó con concentraciones de: 1 mM, 3 mM y 5 mM. (Tabla 11).

TABLA 11: Preparación de la curva patrón de ácido kójico

| | Solución madre | Buffer |
|------------------------|----------------|--------|
| 1 mM (C ₁) | 5 µL | 45 µL |
| 3 mM (C ₂) | 15 µL | 35 µL |
| 5 mM (C ₃) | 25 µL | 25 µL |

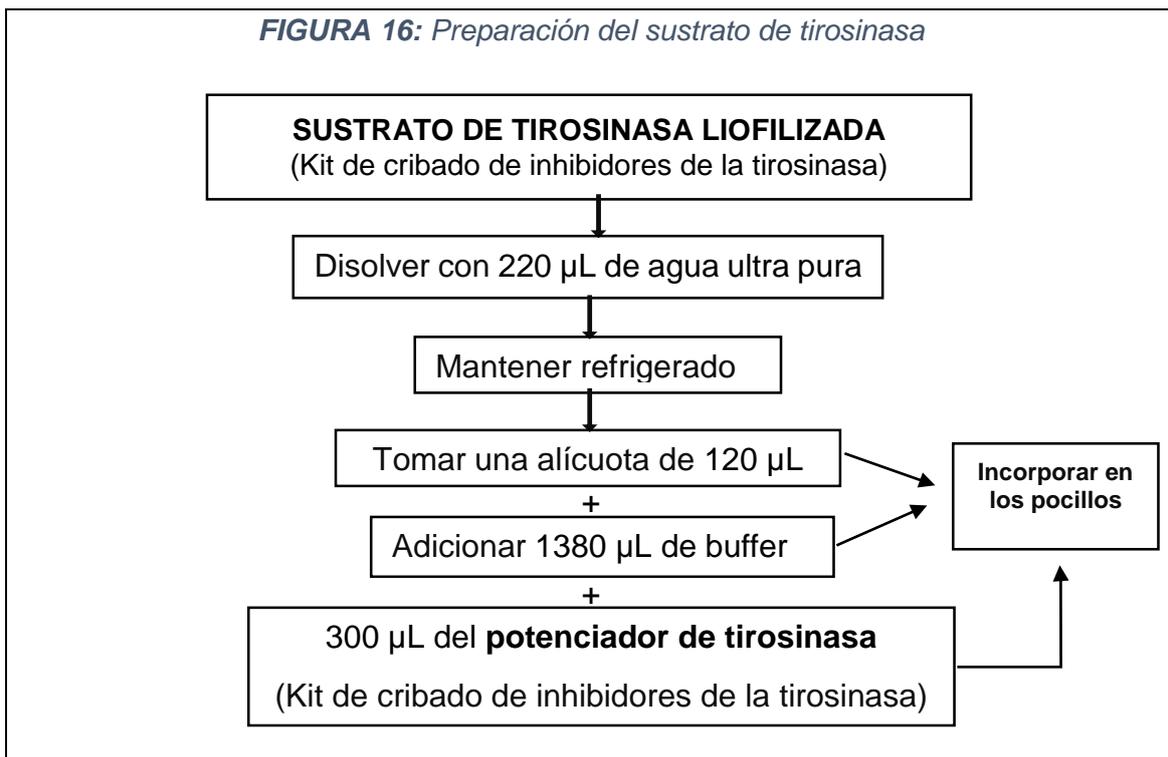
Fuente: Elaboración propia

3) Preparación de la enzima (Tirosinasa)



Fuente: Elaboración propia

4) Preparación del sustrato (L-Tirosina)



Fuente: Elaboración propia

5) **Preparación de los pocillos para el ensayo anti-tirosinasa (Tabla 12).**

En la revisión bibliográfica se encontró escasa información respecto a investigaciones que hayan utilizado el Kit de Cribado de Inhibidores de la tirosinasa MAK257 Sigma-Aldrich, por lo que, las concentraciones de trabajo para esta investigación, se definieron tomando en consideración investigaciones en las que determinaron actividad anti-tirosinasa en muestras vegetales, ajustando los volúmenes (microplacas) que requería el ensayo.

TABLA 12: Preparación de los pocillos para el ensayo anti-tirosinasa

| | B | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₄ | X ₅ | C ₁ | C ₂ | C ₃ |
|---|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Muestra en estudio | - | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL | - | - | - |
| Patrón Ácido kójico | - | - | - | - | - | - | 20µL | 20µL | 20µL |
| Buffer | 20µL | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Enzima (Tirosinasa) | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL |
| Mezclar bien e incubar a 25°C por 10 minutos | | | | | | | | | |
| Sustrato (L-Tirosina) | 30µL | 30µL | 30µL | 30µL | 30µL | 30µL | 30µL | 30µL | 30µL |
| Realizar la lectura a 510 nm cada 10 min durante 60 minutos | | | | | | | | | |
| Donde:
B: Es el blanco
X ₁ : Es la muestra en estudio a concentración de 500 µg/mL
X ₂ : Es la muestra en estudio a concentración de 250 µg/mL
X ₃ : Es la muestra en estudio a concentración de 100 µg/mL
X ₄ : Es la muestra en estudio a concentración de 50 µg/mL.
X ₅ : Es la muestra en estudio a concentración de 25 µg/mL
C ₁ : Es el control a concentración de 1 µg/mL
C ₂ : Es el control a concentración de 3 µg/mL
C ₃ : Es el control a concentración de 5 µg/mL
Los pocillos correspondientes a la muestra en estudio (X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄ y X ₅) se prepararon por triplicado y las lecturas se realizaron a 510 nm siguiendo el modelo cinético: cada 10 minutos durante 60 minutos. | | | | | | | | | |

Fuente: Elaboración propia

- 6) Para calcular la pendiente se seleccionaron dos tiempos T₁ y T₂ y se hizo el cálculo con las absorbancias correspondientes a estos tiempos siguiendo la formula a continuación:

$$Pendiente = \frac{Abs_2 - Abs_1}{T_2 - T_1}$$

Seguidamente el porcentaje de inhibición relativo para la muestra en estudio se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición Tirosinasa} = \frac{\text{Pendiente Blanco} - \text{Pendiente muestra}}{\text{pendiente blanco}} \times 100$$

Y para el control:

$$\% \text{ Inhibición Tirosinasa} = \frac{\text{Pendiente Blanco} - \text{Pendiente control}}{\text{pendiente blanco}} \times 100$$

- 7) Para calcular el IC_{50} teórico, para el control ácido kójico y para la muestra, se utilizó la ecuación de regresión logarítmica correspondiente, despejando “x” y reemplazando “y” por el valor de 50, siendo esta la concentración necesaria para que se reduzca la actividad de la enzima tirosinasa en un 50%.

3.6.6. Evaluación de la capacidad antioxidante de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico

3.6.6.1. por el método DPPH.

1. Preparación del reactivo DPPH.

Se preparó una solución de DPPH de 0.01 M para lo cual se pesaron 1.97 mg del radical DPPH y se disolvió con 50 mL de metanol al 80%, se sónico la solución por un periodo de 15 – 20 minutos para lograr una solución homogénea. Se dejó el reactivo por un periodo de 16 horas, finalizado este tiempo se diluyo con metanol al 80% hasta lograr lecturas de absorbancia igual o menores a 0.8 nm.

2. Preparación de la curva patrón

Para la curva patrón se utilizó Trolox, primeramente, se preparó una solución madre de 50µg/mL, donde se pesaron 0.5 mg y se disolvió con 20 mL de metanol al 80%. A partir de esta solución madre se prepararon diluciones de 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL.

3. Preparación del extracto de *Citrus jambhiri* Lush.

Para la obtención de las diferentes concentraciones de trabajo se preparó una solución madre de 500µg/mL, para lo cual se pesaron 10 mg de extracto seco que se disolvieron con 20 mL de metanol al 80%.

La muestra se trabajó a concentraciones de 62.5, 125 y 250 µg/mL.

4. Preparación de las cubetas para el ensayo Antioxidante por el método DPPH (Tabla 13).

TABLA 13: Preparación de las cubetas para el ensayo antioxidante por el método DPPH

| | Blanco | Trolox
3.125
µg/mL | Trolox
6.25
µg/mL | Trolox
12.5
µg/mL | Trolox
25
µg/mL | Trolox
50
µg/mL | Muestra
62.5
µg/mL | Muestra
125
µg/mL | Muestra
250
µg/mL |
|----------|--------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Metanol | 1 mL | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Extracto | - | - | - | - | - | - | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Trolox | - | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | - | - | - |
| DPPH | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL |

Se agitaron las cubetas y se almacenó en un ambiente oscuro por un periodo de 60 minutos, seguidamente se realizaron las lecturas a 517nm.
Se calibró el espectrofotómetro con metanol al 80%.
Las lecturas se realizaron por triplicado.

Fuente: Elaboración propia

- El porcentaje de captación del radical DPPH se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de captación DPPH} = \frac{\text{Absorbancia Blanco} - \text{Absorbancia (trolox o Muestra)}}{\text{Absorbancia Blanco}} \times 100$$

- La concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC_{50}), del control trolox y la muestra, se calculó mediante la ecuación de regresión lineal correspondiente, despejando "x" y reemplazando "y" por el valor de 50, siendo el dato resultante la concentración necesaria para que se reduzca la actividad del DPPH en un 50%.
- Para calcular el equivalente trolox (TEAC), primeramente se transformó las unidades del IC_{50} resultante de la muestra, de µg/mL a g/mL, seguidamente se utilizó la siguiente fórmula:

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} \text{ Muestra}}$$

3.6.6.2. Por el método ABTS.

- Preparación del reactivo ABTS.
 - (1) Preparación de la solución ABTS 7 mM
 - Se pesó 18 mg de radical ABTS y se diluyó con 5 mL de metanol al 80%.
 - (2) Preparación del persulfato de potasio 2.45 mM
 - Se pesó 3.31 mg de reactivo y se diluyó con 5 mL de metanol al 80%.

La solución del radical ABTS se preparó mezclando 5 mL de la solución (1) con 5 mL de la solución (2), se sónico por 15 minutos y seguidamente se dejó reposando en la oscuridad por un periodo de 16 horas.
- Preparación de la curva patrón

Para la curva patrón se utilizó Trolox, primeramente, se preparó una solución madre de 50µg/mL, donde se pesaron 0.5 mg y se disolvió con 20 mL de metanol al 80%. A partir de esta solución madre se prepararon diluciones de 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL.

- Preparación del extracto de *Citrus jambhiri* Lush.
Para la obtención de las diferentes concentraciones de trabajo se preparó una solución madre de 500µg/mL, para lo cual se pesaron 10 mg de extracto seco que se disolvieron con 20 mL de metanol al 80%.
La muestra se trabajó a concentraciones de 31.25, 62.5 y 125 µg/mL.
- Preparación de las cubetas para el ensayo Antioxidante por el método ABTS (Tabla 14).

TABLA 14: Preparación de las cubetas para el ensayo antioxidante por el método ABTS.

| | Blanco | Trolox
3.125
µg/mL | Trolox
6.25
µg/mL | Trolox
12.5
µg/mL | Trolox
25
µg/mL | Trolox
50
µg/mL | Muestra
31.25
µg/mL | Muestra
62.5
µg/mL | Muestra
125
µg/mL |
|----------|--------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Metanol | 1 mL | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Extracto | - | - | - | - | - | - | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Trolox | - | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | - | - | - |
| ABTS | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL | 3 mL |

Se agitaron las cubetas y se almacenaron en un ambiente oscuro por un periodo de 30 minutos, seguidamente se realizaron las lecturas a 734 nm.
Se calibró el espectrofotómetro con metanol al 80%.
Las lecturas se realizaron por triplicado.

Fuente: Elaboración propia

- El porcentaje de captación se calculó en base a la siguiente ecuación

$$\% \text{ de captación ABTS} = \frac{\text{Absorbancia Blanco} - \text{Absorbancia (trolox o Muestra)}}{\text{Absorbancia Blanco}} \times 100$$

- La concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC_{50}), del control trolox y la muestra, se calculó mediante la ecuación de regresión lineal correspondiente, despejando "x" y reemplazando "y" por el valor de 50, siendo el dato resultante la concentración necesaria para que se reduzca la actividad del ABTS en un 50%.
- Para calcular el equivalente trolox (TEAC), primeramente se transformó las unidades del IC_{50} resultante de la muestra, de µg/mL a g/mL, seguidamente se utilizó la siguiente fórmula:

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} \text{ Muestra}}$$

3.7. Técnicas e instrumentos para la recolección de información

3.7.1. Técnica:

Observación laboratorial, medición cualitativa y cuantitativa: Para la marcha fitoquímica, la determinación del contenido de compuestos fenólicos, para la determinación de la inhibición de la enzima tirosinasa, para la evaluación de la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS, de esa forma obtener las lecturas (absorbancias) con las cuales responder a nuestros objetivos.

3.7.2. Instrumentos:

Fichas de observación y recolección de datos: Para exponer nuestros resultados de la marcha fitoquímica, la cuantificación de compuestos fenólicos, la determinación de la actividad anti-tirosinasa y actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS (**Anexos 2-7**) y los equipos e instrumentos correspondientes para la experimentación, como son: El espectrofotómetro lector de microplacas ELISA para la evaluación de la actividad anti-tirosinasa, el espectrofotómetro UV visible para la evaluación de la actividad antioxidante y para la cuantificación de Compuestos fenólicos.

3.8. Técnicas para el proceso y análisis de datos

- ✚ Los análisis se realizaron por triplicado en la determinación de la actividad anti-tirosinasa, y las lecturas se realizaron siguiendo un modelo cinético cada 10 minutos por un total de 60 minutos. En la determinación de los compuestos fenólicos por el método Folin-ciocalteu y en la determinación de la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS se realizó una sola prueba y las lecturas de las cubetas fueron por triplicado.
- ✚ Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico integrado de Microsoft Office Excel 2016, en una hoja de cálculo se tabularon las absorbancias obtenidas, se realizaron los cálculos y gráficas correspondientes, en la cuantificación de compuestos fenólicos, el porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa y el porcentaje de captación de radicales libres por los métodos DPPH y ABTS, con su respectiva desviación estándar.
- ✚ Para la expresión de los resultados en IC_{50} y GAE se utilizó la técnica estadística de regresión lineal y regresión logarítmica, con el cálculo respectivo del coeficiente de determinación (R^2).

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Obtención del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush.

Los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. se recolectaron en el mes de abril del año 2023 en el CC.PP. Toctohuaylla, los pobladores del mencionado centro poblado refieren que los meses de cosecha de limón rugoso son: marzo, abril y mayo, esta información guarda relación con los datos de “Estacionalidad de los cítricos en el Perú”, de la Dirección de Estadística e Información agraria, donde indica que la mayor producción se da en los meses abril-julio (Midagri-2023). Se seleccionaron en total de 200 frutos en estadios de maduración 2 y 3 de color verde amarillo, se descartaron los frutos amarillos (estadio 4) ya que según Braddock (1999) la concentración de flavonoides en los cítricos disminuye en los frutos maduros, se descartaron también los frutos verdes (estadio 1) esto debido a que la clorofila interfiere en la determinación de compuestos fenólicos y un tratamiento para eliminarlas involucra una retención de polifenoles (66 y 67).

La cáscara de *Citrus jambhiri* Lush. se pone más gruesa y rugosa cuanto más madura (39), en los estadios 2 y 3 las rugosidades de la cáscara no son tan pronunciadas, por ello la extracción del epicarpio, la capa más externa de la cáscara, se realizó por rallado, lo cual además facilitó el secado, se obtuvo un total de 200 gramos de ralladura seca pulverizada que se maceró en metanol al 80% y finalizada la evaporación del solvente se obtuvo 28.969 gramos de extracto seco hidrometanólico (tabla 15).

4.2. Fraccionamiento del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) y porcentaje de rendimiento de la extracción

El fraccionamiento del extracto hidrometanólico con cloroformo se realizó con el objetivo de purificar más aun la muestra de estudio. En la primera extracción con la mezcla metanol: agua, ambos solventes de carácter polar, se buscó extraer compuestos fenólicos, con el fraccionamiento con cloroformo, un solvente de carácter apolar se buscó aislar aquellos compuestos que son de interés para este estudio.

TABLA 15: Determinación del porcentaje de extracción

| Determinación del porcentaje de extracción | |
|--|----------|
| Peso de epicarpio seco triturado correspondiente a 200 limones rugosos. | 200 g |
| Peso del extracto seco hidrometanólico | 28.969 g |
| Porcentaje de extracción hidrometanólica | 14.485% |
| Peso de la fracción clorofórmica del extracto seco hidrometanólico | 7.582 |
| Porcentaje de extracción final | 3.791% |

Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

En la tabla 15 se observa el porcentaje de extracción de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush., obtenido por maceración con cloroformo de extracto hidrometanólico, el cual previamente fue obtenido por maceración del epicarpio de limón rugoso con metanol al 80%, resultando 3.791%, se puede observar que es un porcentaje de extracción bajo, esto debido al paso adicional de purificación con cloroformo.

4.3. Análisis fitoquímico cualitativo

TABLA 16: Análisis Fitoquímico Cualitativo de la Fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush.

| METABOLITO SECUNDARIO | REACTIVO | RESULTADOS |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------|
| Flavonoides | Ensayo de Shinoda | ++ |
| Compuestos fenólicos | Tricloruro Férrico $FeCl_3$ | +++ |
| Quinonas | Reactivo Borntrager | ++ |
| Taninos | Ensayo de gelatina | ++ |
| Azúcares reductores | Ensayo de Fehling | +++ |
| Lactonas sesquiterpénicas | Ensayo de Liebermann-Burchard | ++ |
| Saponinas | Ensayo de espuma | - |
| Identificación de alcaloides: | Reactivo Dragendorff | ++ |

LEYENDA:
 +++: Abundante cantidad
 ++: Regular cantidad
 +: Poca cantidad
 -: Ausente

Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

La evaluación fitoquímica de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. se determinó utilizando ensayos específicos para cada metabolito, del mismo modo la valoración cualitativa se interpretó de acuerdo a las especificaciones para cada ensayo, considerándose cambio de coloración e intensidad, presencia de precipitado o turbidez.

Como esta descrito en la tabla 16 se determinó presencia en abundante cantidad de compuestos fenólicos y azúcares reductores, presencia en regular cantidad de flavonoides, quinonas, taninos, alcaloides, lactonas sesquiterpénicas y ausencia de saponinas.

En la investigación de **Condo M. y Quispe J. (2019)** (29), donde determinaron la composición fitoquímica del epicarpio de la naranja huando, evidenciaron la presencia de alcaloides, quinonas, flavonoides y polifenoles, reportaron también la presencia de compuestos reductores, se observa similitud con nuestros resultados, esto debido a que se trata también de una especie cítrica.

4.4. Cuantificación de compuestos fenólicos

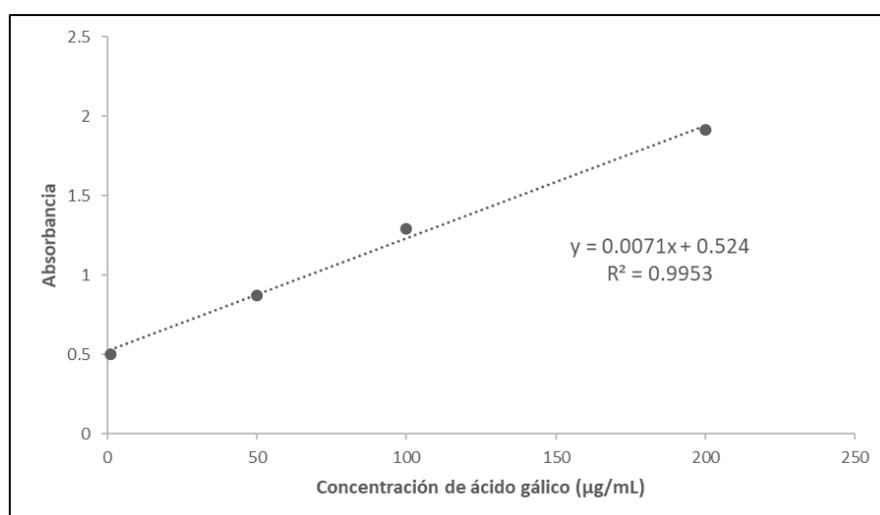
4.4.1. Curva de calibración con ácido gálico

TABLA 17: Resultados de las absorbancias del ácido gálico

| Concentración de ácido gálico (µg/mL) | Absorbancia | | Promedio de absorbancias |
|---------------------------------------|-------------|-----------|--------------------------|
| | Lectura 1 | Lectura 2 | |
| 1 | 0.503 | 0.504 | 0.504 |
| 50 | 0.876 | 0.876 | 0.876 |
| 100 | 1.292 | 1.293 | 1.293 |
| 200 | 1.908 | 1.919 | 1.914 |

Fuente Datos experimentales del estudio

FIGURA 17: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón ácido gálico versus sus valores de absorbancia



Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

En la figura 17 se muestra la curva de calibración del ácido gálico obtenido a partir de los datos de la tabla 17, donde se realizaron las lecturas a 765 nm, como resultado se obtuvo una ecuación de la recta $y = 0.0071x + 0.524$, con un R^2 (Coeficiente de determinación) igual a 0.9953, lo que significa que esta ecuación de la recta establece un 99.53% de relación directa entre las absorbancias y la concentración de ácido gálico. Con estos datos se determina el contenido en compuestos fenólicos en la muestra en estudio, expresados en equivalentes gramos de ácido gálico por 100 gramos de muestra.

4.4.2. Cuantificación de compuestos fenólicos de la fracción clorofórmica

TABLA 18: Resultados de las absorbancias para la cuantificación de compuestos fenólicos en la especie en estudio

| Concentración de muestra ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbancia | | | Promedio de absorbancias |
|---|-------------|-----------|-----------|--------------------------|
| | Lectura 1 | Lectura 2 | Lectura 3 | |
| 100 | 1.209 | 1.209 | 1.210 | 1.209 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

Conforme a lo obtenido en la figura 17, donde se aprecia la ecuación de la regresión lineal ($y = 0.0071x + 0.524$), se observa que en el eje "y" están los valores de absorbancia y en el eje "x" los valores de las concentraciones de ácido gálico. Por lo tanto, para determinar la concentración de compuestos fenólicos a partir de los valores de las absorbancias, se despeja la variable x en la ecuación, obteniendo así:

$$x = \frac{y - 0.524}{0.0071}$$

Con esta nueva ecuación se reemplazan los datos obtenidos de las absorbancias para la muestra, obteniéndose así la concentración de compuestos fenólicos.

TABLA 19: Contenido de compuestos fenólicos en la muestra en estudio

| muestra ($\mu\text{g/mL}$) | Concentración de Compuestos fenólicos | | | Promedio de concentraciones (μg ácido gálico) |
|------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|---|
| | Lectura 1 | Lectura 2 | Lectura 3 | |
| 100 | 96.479 | 96.479 | 96.620 | 96.526 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis, interpretación y discusión de resultados

La tabla 19 muestra el valor teórico del contenido de compuestos fenólicos, si se expresa este resultado por cada gramo de extracto obtenido, tenemos: 965.4 mg GAE/g FC (3.66 g GAE/100 gramos PS), este valor fue calculado considerando el porcentaje de rendimiento de la extracción.

En la investigación de **Ordoñez E., Reátegui D. Y Villanueva J. (2018)** (30), obtuvieron que la cáscara de *Citrus jambhiri* tiene un contenido de polifenoles de 1.42 ± 0.03 expresados en gramos equivalente a Ácido gálico/100 g muestra. Comparando los resultados de la presente investigación con los resultados de Ordoñez y colaboradores, se puede observar una diferencia significativa, esto deducible por la diferencia en el método de extracción utilizado, el tiempo de extracción empleado y el grado de madurez del fruto utilizado en el experimento, con lo cual se concluye que el grado de madurez del fruto, el método y tiempo de extracción influirán en el contenido de compuestos fenólicos del extracto final.

En la investigación de **Anticona M. (2022)** (24), obtuvo que el contenido de compuestos fenólicos totales en las pieles de mandarinas híbridas de las variedades: Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique a los 30 minutos de extracción asistida por ultrasonido, fue de: 952 ± 68 , 945 ± 215 y 1230 ± 310 mg GAE/100 g PF respectivamente, igualmente se observa una diferencia significativa, esto además de ser influido por el solvente y el método de extracción, también puede deberse a que son diferentes especies cítricas.

4.5. Determinación de la actividad anti-tirosinasa

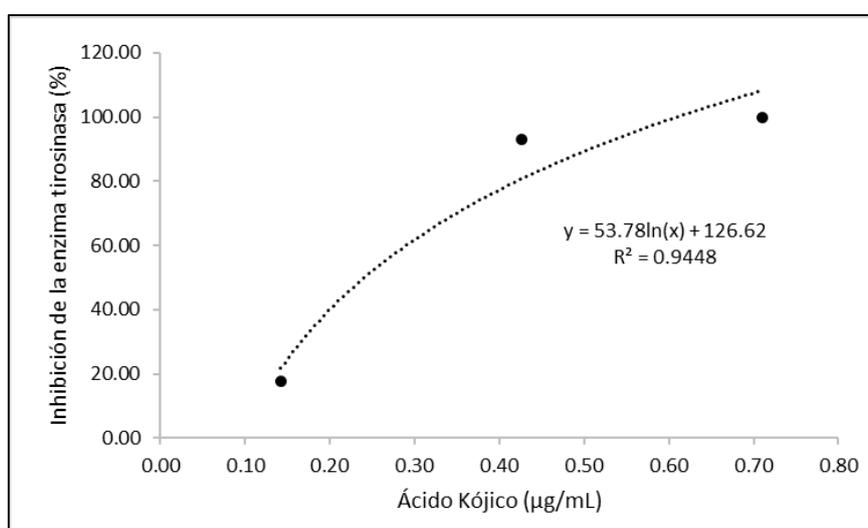
4.5.1. Curva de calibración con ácido kójico

TABLA 20: Porcentajes de inhibición de la enzima tirosinasa a diferentes concentraciones de ácido kójico

| ÁCIDO KÓJICO (µg/mL) | ABSORBANCIAS | | Δabs. | Δt. | PENDIENTE | INHIBICIÓN DE LA TIROSINASA (%) |
|----------------------|--------------|--------|-------|-----|-----------|---------------------------------|
| | 40 min | 60 min | | | | |
| 0.14 | 0.046 | 0.069 | 0.023 | 20 | 0.00115 | 17.85714286 |
| 0.43 | 0.039 | 0.041 | 0.002 | 20 | 0.0001 | 92.85714286 |
| 0.71 | 0.043 | 0.043 | 0 | 20 | 0 | 100 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

FIGURA 18: Gráfica de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón ácido kójico versus el porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa



Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

En la figura 18 se muestra la curva de calibración del patrón Ácido kójico obtenido a partir de los datos de la tabla 20, donde se observa la relación de las diferentes concentraciones de Ácido kójico versus sus porcentajes de Inhibición de la enzima tirosinasa, la ecuación de la línea de tendencia es $y = 53.78\ln(x) + 126.62$, con un R^2 (Coeficiente de determinación) igual a 0.9448, lo cual establece que esta ecuación tiene un 94.48 % de relación directa entre el porcentaje de Inhibición de la enzima tirosinasa y la concentración del patrón Ácido kójico.

4.5.2. Determinación de la concentración inhibitoria (IC_{50}) del patrón ácido kójico

El IC_{50} teórico se calculó mediante la ecuación de regresión logarítmica de la figura 18, despejando “x” se tiene:

$$x = e^{\frac{y-126.62}{53.78}}$$

Con lo cual, reemplazando “y” por el valor de 50, resulta un valor de “x” igual a 0.241

Análisis e interpretación

Para reducir la actividad de la enzima tirosinasa en un 50% son necesarios 0.241 $\mu\text{g/mL}$ de Ácido kójico lo cual nos indica que su $IC_{50} = 0.241 \mu\text{g/mL}$.

En el estudio de **Condo M. y Quispe J. (2019)** (29) para el ácido kójico obtuvieron un $IC_{50} = 0.023 \text{ mg/mL}$ (23 $\mu\text{g/mL}$) utilizando la metodología de Vardhan con ligeras modificaciones y en el estudio de **Wuttisin N., Boonmak J., Thaipitak V., Thitilerdecha N. Y Kittigowittana K. (2017)** (3) para el ácido kójico obtuvieron un $IC_{50} = 10.80 \mu\text{g/mL}$, por el método modificado de Chang *et al.* Se puede observar que existen diferencias en los resultados de IC_{50} , se considera que esto es a raíz de la metodología utilizada para cada estudio.

4.5.3. Curva de calibración de la muestra

TABLA 21: Resultados de las absorbancias de la muestra.

| MUESTRA
($\mu\text{g/mL}$) | ABSORBANCIAS | | | | | |
|---------------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 0 MIN | | | 20 MIN | | |
| | Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 | Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 |
| 25 | 0.056 | 0.057 | 0.055 | 0.230 | 0.222 | 0.238 |
| 50 | 0.056 | 0.052 | 0.060 | 0.217 | 0.205 | 0.228 |
| 100 | 0.053 | 0.051 | 0.049 | 0.207 | 0.197 | 0.172 |
| 250 | 0.048 | 0.057 | 0.063 | 0.144 | 0.142 | 0.146 |
| 500 | 0.047 | 0.047 | 0.056 | 0.109 | 0.102 | 0.113 |

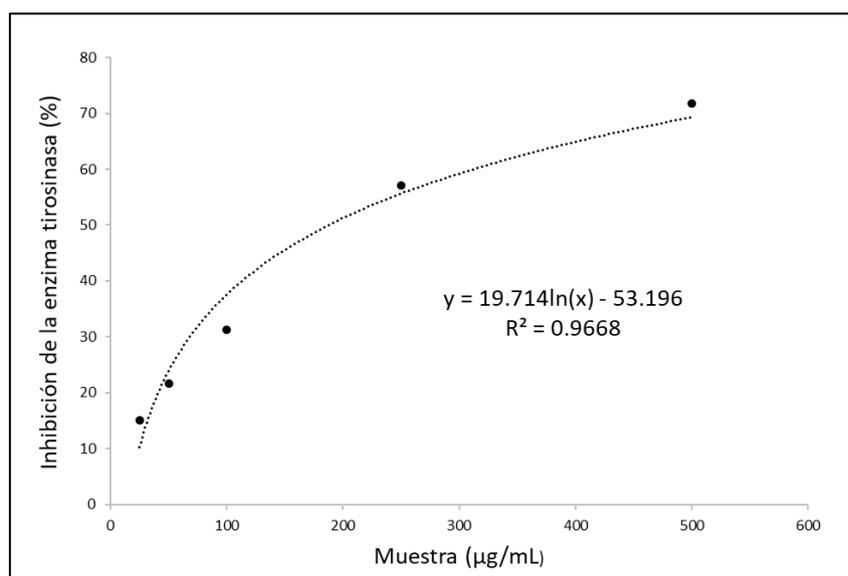
Fuente: Datos experimentales del estudio

TABLA 22: Porcentajes de inhibición de la enzima tirosinasa a diferentes concentraciones de la muestra

| MUESTRA (µg/mL) | ABSORBANCIAS PROMEDIO | | Δabs. | Δt. | PENDIENTE | INHIBICIÓN DE LA TIROSINASA (%) |
|-----------------|-----------------------|--------|-------|-----|-----------|---------------------------------|
| | 0 min | 20 min | | | | |
| 25 | 0.056 | 0.230 | 0.174 | 20 | 0.009 | 15.12 |
| 50 | 0.056 | 0.217 | 0.161 | 20 | 0.008 | 21.63 |
| 100 | 0.051 | 0.192 | 0.141 | 20 | 0.007 | 31.22 |
| 250 | 0.056 | 0.144 | 0.088 | 20 | 0.004 | 57.07 |
| 500 | 0.050 | 0.108 | 0.058 | 20 | 0.003 | 71.71 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

FIGURA 19: Gráfica de dispersión y línea de tendencia de la concentración de la muestra versus el porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa



Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

En la figura 19 se muestra la curva de dispersión y línea de tendencia a diferentes concentraciones de la muestra, obtenido a partir de los datos de la tabla 22, donde se observa la relación de las diferentes concentraciones de la muestra en estudio versus sus porcentajes de inhibición de la enzima tirosinasa, la ecuación de la línea de tendencia es: $y = 19.714\ln(x) - 53.196$, con un R^2 (Coeficiente de determinación) igual a 0.9668, la cual establece que esta ecuación tiene un 96.68% de relación directa entre el porcentaje de Inhibición de la enzima tirosinasa y la concentración de la muestra.

En la figura 19 se puede observar la cinética de inhibición enzimática de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio del limón rugoso sobre la enzima tirosinasa, donde se tiene una curva similar a la descrita en el estudio de Muñoz D. y colaboradores, que describe la inhibición de la enzima tirosinasa de los diferentes

extractos de *Ruta graveolens* (68). Esta curva la describen también, De Arriaga Dolores y colaboradores en su libro *Cinética Enzimática: manejo de datos*, como una Inhibición del tipo competitiva (69). Concluyendo así por la gráfica obtenida en este ensayo, que los metabolitos presentes en la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico, son inhibidores reversibles competitivos, donde estos metabolitos secundarios se unen a su sitio activo de la enzima, desplazando al sustrato L-tirosina (70).

4.5.4. Determinación de la concentración inhibitoria (IC_{50}) de la muestra

Se determinó el IC_{50} de la muestra, usando la ecuación de regresión logarítmica de la figura 19; así, despejando “x” se tiene:

$$x = e^{\frac{y+53.196}{19.714}}$$

Con lo cual, reemplazando “y” por el valor de 50, resulta un valor de “x” igual a 187.66.

Análisis, interpretación y discusión de resultados

Para reducir la actividad de la enzima tirosinasa en un 50% son necesarios 187.66 $\mu\text{g/mL}$ de la muestra en estudio lo cual nos indica que su $IC_{50} = 187.66 \mu\text{g/mL}$.

En los estudios de **Wuttisin N., Boonmak J., Thaipitak V., Thitilerdecha N. Y Kittigowittana K. (2017)** (3), para el extracto etanólico de cáscara de naranja obtuvieron un IC_{50} de 255.10 $\mu\text{g/mL}$, siendo menos eficaz al ácido kójico, el cual tuvo un IC_{50} de 10.80 $\mu\text{g/mL}$, pudiéndose observar que la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del limón rugoso tiene mejor efecto anti-tirosinasa que el extracto etanólico de naranja.

En la investigación de **Ilyas H., Hanif U., Ali A., Hassan Tarar Z., Javed H., Tahir T. Y Rafiq M. (2021)** (25), determinaron que el extracto metanólico de la cáscara de *Citrus bergamia* fraccionado con cloroformo posee un IC_{50} de $35.2 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$ mucho mayor al extracto fraccionado con acetato de etilo $4.1 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ y menor al extracto fraccionado con hexano $142.7 \pm 21.2 \mu\text{g/mL}$, se observa que los métodos de extracción son similares al realizado en esta investigación, sin embargo existe una marcada diferencia entre los valores de IC_{50} , lo que indudablemente indica que *Citrus bergamia* posee un mejor efecto anti-tirosinasa que *Citrus jambhiri* Lush.

En los estudios de **Condo M. y Quispe J. (2019)** (29), al determinar la actividad anti-tirosinasa del epicarpio de la naranja huando, obtuvieron un IC_{50} de 0.023 mg/mL para el patrón trolox y un IC_{50} de 1.54 mg/mL para el extracto con acetato de etilo y 5.23 mg/mL para el extracto con metanol, comparando con nuestros resultados, se observa que, *Citrus jambhiri* Lush. posee mejor actividad anti-tirosinasa que los extractos metanólico y etil acetato de la naranja huando.

Se puede observar que en todas las investigaciones anteriores, las muestras en estudio obtuvieron un IC_{50} mayor al del patrón ácido kójico, de igual modo en la presente investigación se obtuvo un IC_{50} mayor en la muestra en estudio, lo que indica que su capacidad de inhibir la enzima tirosinasa es menor al del ácido kójico; sin embargo, comparado a las otras especies cítricas exceptuando el extracto metanólico fraccionado con acetato de etilo de *Citrus bergamia*, nuestro extracto posee mejor actividad anti-tirosinasa.

4.6. Determinación de la actividad antioxidante

4.6.1. Por el método DPPH

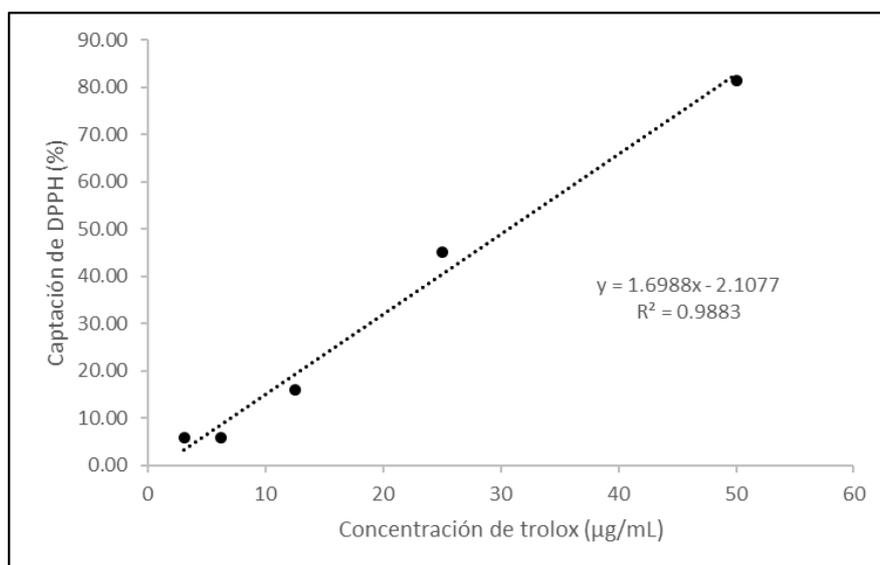
4.6.1.1. Curva de calibración con trolox

TABLA 23: Porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de trolox

| Concentración de trolox ($\mu\text{g/mL}$) | ABSORBANCIA | | | Captación de DPPH (%) |
|--|-------------|-----------|-----------|-----------------------|
| | Lectura 1 | Lectura 2 | Lectura 3 | |
| 3.125 | 0.591 | 0.591 | 0.591 | 5.892 |
| 6.25 | 0.592 | 0.592 | 0.592 | 5.732 |
| 12.5 | 0.528 | 0.528 | 0.529 | 15.870 |
| 25 | 0.345 | 0.345 | 0.345 | 45.064 |
| 50 | 0.116 | 0.116 | 0.117 | 81.48 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

FIGURA 20: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón trolox versus el porcentaje de captación de DPPH.



Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

En la figura 20 se muestra la curva de calibración de trolox obtenido a partir de los datos de la tabla 23 donde se observa la relación de las diferentes concentraciones de trolox versus sus porcentajes de captación del DPPH. En la figura 20 se aprecia la ecuación de la recta: $y = 1.6988x - 2.1077$, con un R^2 (Coeficiente de determinación) igual a 0.9883, lo cual establece que esta ecuación de la recta tiene un 98.83% de relación directa entre el porcentaje de captación de DPPH y la concentración del patrón trolox.

4.6.1.2. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC_{50}) del trolox.

El IC_{50} para el patrón trolox se calculó mediante la ecuación de regresión lineal de la figura 20; así, despejando "x" se tiene:

$$x = \frac{y + 2.1077}{1.6988}$$

Con lo cual, reemplazando “y” por el valor de 50, resulta un valor de “x” igual a 30.673

Análisis e interpretación

Para reducir la actividad del DPPH en un 50% son necesarios 30.673 µg/mL de trolox lo cual nos indica que su $IC_{50} = 30.673 \mu\text{g/mL}$.

En el estudio de **Apaza N. y Huamani L. (2023)** (71) para el control trolox obtuvieron un $IC_{50} = 179.677 \mu\text{g/mL}$, se observa una diferencia con respecto al presente estudio, esto es influenciado por las características propias del ensayo, como son el solvente, las concentraciones y volúmenes de trabajo.

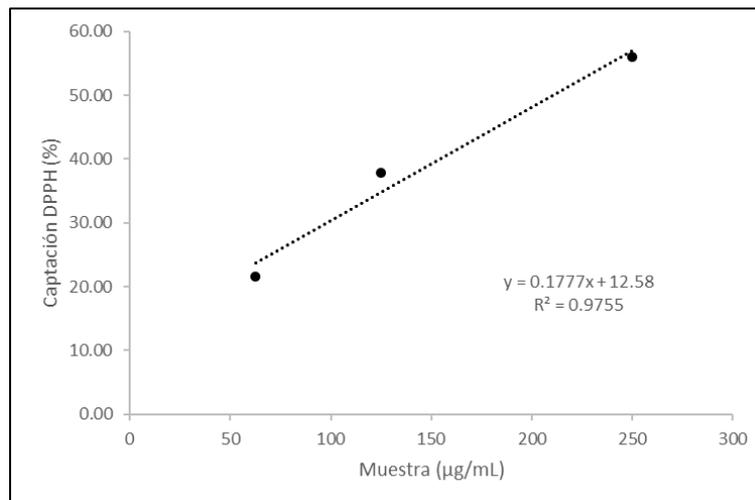
4.6.1.3. Porcentaje de captación de DPPH a diferentes concentraciones de la muestra en estudio.

TABLA 24: Resultados del porcentaje de captación de DPPH a distintas concentraciones de la muestra

| Muestra (µg/mL) | Absorbancias | | | Porcentaje de captación de DPPH (%) | Desviación estandar |
|-----------------|--------------|-----------|-----------|-------------------------------------|---------------------|
| | Lectura 1 | Lectura 2 | Lectura 3 | | |
| 62.5 | 0.492 | 0.492 | 0.492 | 21.66 | 0.000 |
| 125 | 0.39 | 0.39 | 0.391 | 37.85 | 0.001 |
| 250 | 0.276 | 0.276 | 0.277 | 56.00 | 0.001 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

FIGURA 21: Gráfico de dispersión con los valores de porcentaje de captación de DPPH por las muestra a diferentes concentraciones.



Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

En la figura 21 se observa la curva obtenida a partir de los porcentajes de captación de cada una de las concentraciones de trabajo de la muestra, donde se observa la relación

de las diferentes concentraciones de muestra versus sus porcentajes de captación de DPPH. En la figura 21 se aprecia la ecuación de la recta: $y = 0.1777x + 12.58$, con un R^2 (Coeficiente de determinación) igual a 0.9755, lo cual establece que esta ecuación de la recta tiene un 97.55% de relación directa entre el porcentaje de captación de DPPH y la concentración de la muestra.

4.6.1.4. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC_{50}) de la muestra en estudio.

Se determinó el IC_{50} para la actividad antioxidante de la muestra en estudio, por el método DPPH, utilizando la ecuación de regresión lineal de la figura 21, de tal forma despejando “x” se tiene:

$$x = \frac{y - 12.58}{0.1777}$$

Reemplazando “y” por el valor de 50, “x” sería igual a 210.580

Análisis, interpretación y discusión de resultados

La concentración necesaria de la muestra en estudio para reducir la actividad del DPPH en un 50% es de 210.580 $\mu\text{g/mL}$, por lo tanto el $IC_{50} = 210.580 \mu\text{g/mL}$.

En la investigación de **Delgado M. (2020)** (26), al determinar la actividad antioxidante por el método DPPH de los extractos alcohólico y acuoso de la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), obtuvo un IC_{50} de 122.96 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto acuoso y 23.99 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto alcohólico, donde a pesar de ser la misma especie en estudio la diferencia en la actividad antioxidante se debe a que el extracto etanólico tiene flavonoides a diferencia del extracto acuoso que solo tiene taninos y fenoles.

En la investigación de **Ilyas H., Hanif U., Ali A., Hassan Tarar Z., Javed H., Tahir T. Y Rafiq M. (2021)** (25), determinaron por el método DPPH que el extracto metanólico crudo de la cáscara de *Citrus bergamia* posee un IC_{50} de $125.9 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ siendo el con mayor potencial antioxidante comparado a los extractos metanólicos de hojas y pulpa.

En la investigación de **Ordoñez E., Reátegui D. y Villanueva J. (2018)** (30), obtuvieron que la cáscara de *Citrus jambhiri* Lush. tiene un IC_{50} de $4.26 \pm 1.23 \text{ mg/mL}$ por el método DPPH, comparando con los resultados de esta investigación, se observa que el método y tiempo de extracción (En el estudio de Ordoñez se utilizó agitación por 24h. En el presente estudio se utilizó maceración por 15 días) y la adición de un proceso adicional de purificación, como es el fraccionamiento con cloroformo que se realizó en este estudio mejoran notablemente la capacidad de captar radicales libres.

4.6.1.5. Determinación de la actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. por el método DPPH.

Para calcular el equivalente trolox, primeramente, se transformó las unidades de la muestra de $\mu\text{g/mL}$ a g/mL , seguidamente se utilizó la siguiente fórmula.

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} \text{ Muestra}}$$

Reemplazando los datos obtenidos resulta:

$$TEAC = \frac{30.673 \mu\text{g/mL}}{0.00021058 \text{ g/mL}} = 145659.607 \mu\text{g/g}$$

Análisis, interpretación y discusión de resultados

La actividad antioxidante por el método DPPH de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. expresada en equivalentes trolox = 145.66 mg trolox / g FC y expresada por 100 gramos de epicarpio seco tendríamos 552.2 mg trolox / 100 g PS.

Anticona M. (2022) (24) en su investigación obtuvo que la actividad antioxidante determinada por el método DPPH de las pieles de las 3 variedades de mandarinas híbridas: Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique a los 30 minutos de extracción asistida por ultrasonido, fue de: 14.2±4.0, 9.0±1.4 y 9.1±2.6 mmol TE/ 100 g PF respectivamente, en base a ello podemos afirmar que la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio del limón rugoso posee menor actividad antioxidante que las pieles de las mandarinas híbridas Clemenvilla, Nadorcott y Ortanique, por el método DPPH.

En la investigación de **Montenegro M. y colaboradores (2021)** (72), obtuvieron que la actividad antioxidante de los residuos de naranja (*Citrus sinensis*) por el método DPPH expresado en equivalentes trolox fue: 1.31±0.10 mg de trolox / g PF, se observa que los residuos de naranja poseen menor actividad antioxidante que la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio del limón rugoso, por el método DPPH.

4.6.2. Por el método ABTS

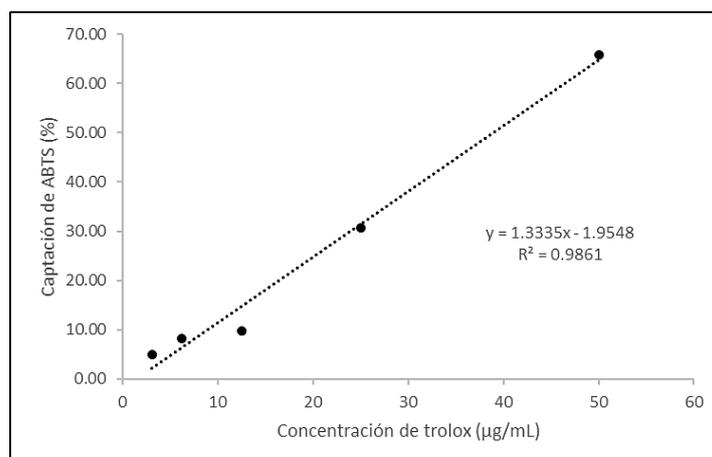
4.6.2.1. Curva de calibración con trolox

TABLA 25: Porcentaje de captación de ABTS a distintas concentraciones de trolox

| Concentración de trolox (µg/mL) | ABSORBANCIA | | | Captación de ABTS (%) |
|---------------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------------------|
| | LECTURA 1 | LECTURA 2 | LECTURA 3 | |
| 3.125 | 0.457 | 0.458 | 0.458 | 4.851 |
| 6.25 | 0.441 | 0.442 | 0.442 | 8.177 |
| 12.5 | 0.434 | 0.434 | 0.434 | 9.771 |
| 25 | 0.333 | 0.333 | 0.334 | 30.700 |
| 50 | 0.164 | 0.164 | 0.164 | 65.904 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

FIGURA 22: Gráfico de dispersión y línea de tendencia de la concentración del patrón trolox versus el porcentaje de captación de ABTS.



Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación de resultados

En la figura 22 se muestra la curva de calibración de trolox obtenido a partir de los datos de la tabla 25, donde se establece la relación de las diferentes concentraciones de trolox versus sus porcentajes de captación del ABTS. En la figura 22 se aprecia la ecuación de regresión lineal $y = 1.3335x - 1.9548$, con un R^2 (Coeficiente de determinación) igual a 0.9861, lo cual establece que esta ecuación de la recta tiene un 98.61% de relación directa entre el porcentaje de captación de ABTS y la concentración del patrón trolox.

4.6.2.2. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC_{50}) del trolox.

Se determinó mediante la ecuación de regresión lineal de la figura 22; así, despejando la ecuación resulta:

$$x = \frac{y + 1.9548}{1.3335}$$

Con lo cual, reemplazando “y” por el valor de 50, resulta un valor de “x” igual a 38.961 µg/mL de trolox. Siendo esta la concentración necesaria Para que se reduzca la actividad del ABTS en un 50%.

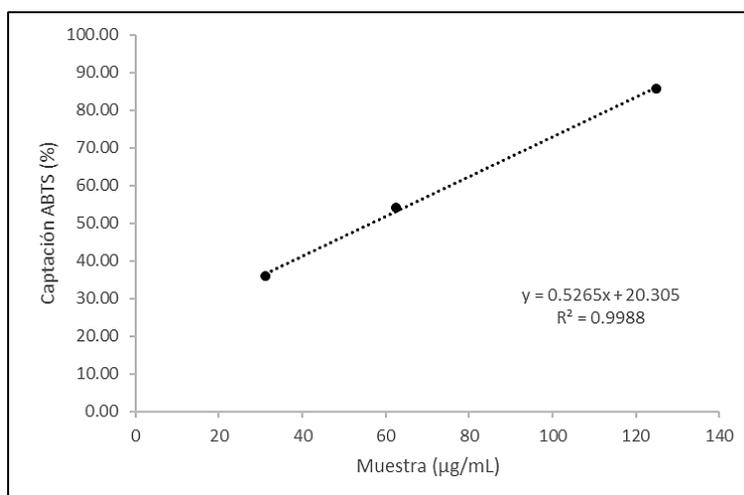
4.6.2.3. Porcentaje de captación de ABTS a diferentes concentraciones de la muestra en estudio.

TABLA 26: Resultados del porcentaje de captación de ABTS a distintas concentraciones de la muestra

| muestra (µg/mL) | Absorbancias | | | Porcentaje de captación de ABTS (%) | Desviación estandar |
|-----------------|--------------|-----------|-----------|-------------------------------------|---------------------|
| | Lectura 1 | Lectura 2 | Lectura 3 | | |
| 31.25 | 0.307 | 0.307 | 0.308 | 36.11 | 0.001 |
| 62.5 | 0.22 | 0.22 | 0.221 | 54.19 | 0.001 |
| 125 | 0.068 | 0.068 | 0.069 | 85.79 | 0.001 |

Fuente: Datos experimentales del estudio

FIGURA 23: Gráfico de dispersión con los valores de porcentaje de captación de ABTS por las muestra a diferentes concentraciones



Fuente: Datos experimentales del estudio

Análisis e interpretación

En la figura 23 se observa la curva obtenida a partir de los porcentajes de captación de cada una de las concentraciones de trabajo de la muestra, donde se establece la relación de las diferentes concentraciones de muestra versus sus porcentajes de captación de ABTS. En la figura 23 se aprecia la ecuación de regresión lineal $y = 0.5265x + 20.305$, con un R^2 (Coeficiente de determinación) igual a 0.9988, lo cual establece que esta ecuación de la recta tiene un 99.88% de relación directa entre el porcentaje de captación de ABTS y la concentración de la muestra.

4.6.2.4. Determinación de la concentración necesaria para inhibir el 50% de especies oxidantes (IC_{50}) de la muestra en estudio.

Se determinó mediante la ecuación de regresión lineal de la figura 23; así, despejando la ecuación resulta:

$$x = \frac{y - 20.305}{0.5265}$$

Con lo cual, reemplazando “y” por el valor de 50, resulta un valor de “x” igual a 56.401.

Análisis, interpretación y discusión de resultados

La concentración necesaria de la muestra en estudio para reducir la actividad del ABTS en un 50% es de 56.401 µg/mL, por lo tanto el $IC_{50} = 56.401$ µg/mL.

En la investigación de **Ordoñez E., Reátegui D. y Villanueva J. (2018)** (30), obtuvieron que la cáscara de *Citrus jambhiri* Lush. tiene un IC_{50} de 247 ± 9.1 µg/mL por el método ABTS, con lo cual podemos concluir que el paso adicional que se realizó en esta investigación (fraccionamiento con cloroformo) mejora significativamente la capacidad antioxidante de la cascara de *Citrus jambhiri* Lush (limón rugoso).

4.6.2.5. Determinación de la actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de *Citrus jambhiri* Lush. por el método ABTS.

Para calcular el equivalente trolox, primeramente, se transformó las unidades de la muestra de µg/mL a g/mL, seguidamente se utilizó la siguiente fórmula.

$$TEAC = \frac{IC_{50} Trolox}{IC_{50} Muestra}$$

Reemplazando los datos obtenidos se tiene:

$$TEAC = \frac{38.961 \mu\text{g/mL}}{0.000056401 \text{ g/mL}} = 690785.624 \text{ ug /g}$$

Análisis, interpretación y discusión de resultados

La fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del limón rugoso presenta una actividad antioxidante equivalente a trolox TEAC= 690.786 mg de trolox /g FC y expresado por 100 gramos de epicarpio seco tendríamos TEAC= 2.619 g de trolox/ 100 g PS.

En la investigación de **Montenegro M. y colaboradores (2021)** (72), obtuvieron que la actividad antioxidante de los residuos de naranja (*Citrus sinensis*) por el método ABTS expresados en equivalentes trolox fue: 0.36±0.04 mg de trolox / g PF, cuyo resultado presenta una gran diferencia con el resultado por el método DPPH (1.31±0.10 mg de trolox / g PF).

En la presente investigación se observa un comportamiento similar, la capacidad antioxidante por el método DPPH y ABTS difieren ampliamente; sin embargo, fue por el método ABTS por el cual se obtuvo mejor actividad antioxidante. Para el patrón trolox los valores de IC_{50} resultaron relativamente similares por ambos métodos, DPPH y ABTS, teniendo $IC_{50} = 30.673 \mu\text{g/mL}$ y un $IC_{50} = 38.961 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. En la muestra en estudio se observa una diferencia en los valores de IC_{50} , donde por el método DPPH se obtuvo un $IC_{50} = 210.580 \mu\text{g/mL}$ y por el método ABTS se obtuvo un $IC_{50} = 56.401$. Se concluye que está marcada diferencia se debe a que en un primer plano con la extracción hidrometanólica, se extraen metabolitos secundarios de carácter polar, y con el fraccionamiento con cloroformo se separan los metabolitos secundarios de carácter menos polar como las isoflavonas, flavanonas, flavonas y flavanoles; y, al ser el reactivo ABTS soluble en solventes acuosos y orgánicos, lo cual le otorga la cualidad de poder determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica, puede determinar la actividad antioxidante de forma más completa (73).

CONCLUSIONES

1. Se determinó que la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) presenta importante actividad anti-tirosinasa y antioxidante.
2. Se obtuvo el extracto seco hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) y se determinó que tiene un 14.5% de rendimiento de extracción.
3. Se fraccionó el extracto seco hidrometanólico utilizando el solvente cloroformo ($CHCl_3$) mediante el método de maceración, el cual tuvo un 3.791% de rendimiento final en la extracción.
4. Se aplicaron las pruebas de identificación fitoquímica en la fracción clorofórmica y se determinó presencia en abundante cantidad de compuestos fenólicos y azúcares reductores, regular cantidad de flavonoides, quinonas, taninos, alcaloides, lactonas sesquiterpénicas y ausencia de saponinas.
5. Se cuantificaron los compuestos fenólicos en la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso), obteniendo 965.4 mg GAE/g FC.
6. Se determinó que la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) presenta actividad anti-tirosinasa con un $IC_{50}=187.66 \mu\text{g/mL}$.
7. La fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico elaborado a partir del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso) presenta importante actividad antioxidante por el método ABTS con un $IC_{50} = 56.401 \mu\text{g/mL}$ equivalente a 690.786 mg de trolox/ g FC, y por el método DPPH el $IC_{50} = 210.580 \mu\text{g/mL}$ equivalente a 145.66 mg de trolox/ g FC.

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

- ✚ A LAS AUTORIDADES Y DOCENTES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DE CUSCO
 - ✓ Continuar fomentando la investigación fitoquímica y farmacología para profundizar en el conocimiento de las propiedades bioactivas del limón rugoso.
 - ✓ Incentivar al estudio sobre la importancia de los residuos cítricos, sobre todo sus componentes bioactivos y actividades biológicas aplicables en el área médica, farmacéutica, dermatológica y cosmética.

- ✚ A LOS ESTUDIANTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
 - ✓ Se sugiere desarrollar formulaciones con propiedades anti-tirosinasa y antioxidantes para la industria cosmética y farmacéutica.
 - ✓ Investigar sobre las aplicaciones dermatológicas, además de la actividad antioxidante y anti-tirosinasa, de los polifenoles y flavonoides provenientes de la cáscara de *Citrus jambhiri* y su potencial en la industria farmacéutica.
 - ✓ Evaluar otras especies con propiedades aclaradoras de la piel para el tratamiento de la hipermelanosis causados por factores internos y externos.
 - ✓ Investigar sobre otros métodos y técnicas de identificación, cuantificación, aislamiento y purificación de metabolitos secundarios bioactivos, que sean más eficientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lemmel J. Sustancias despigmentantes y métodos de aclaramiento del color de la piel. [Online].; 2002 Octubre; 21(9) [cited 2023 Mayo. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/414487>.
2. Lipsker D, Boeckler P. Hiperpigmentaciones. EMC-Dermatología. [Online].; 2006; 40(4): p. 1-16 [cited 2023 Mayo. Available from: <https://www.em-consulte.com/es/article/56050/hiperpigmentaciones>.
3. Wuttinsin N, Boonmak J, Thaipitak V, Thitilertdecha N, Kittigowittana K. Actividad anti-tirosinasa del extracto de la cáscara de naranja y formulación cosmética [Anti-tyrosinase activity of orange peel extract and cosmetic formulation]. International food research journal. [Online].; 2017; 24(5): p.2128-2132 [cited 2023 Abril. Available from: [http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20\(05\)%202017/\(40\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20(05)%202017/(40).pdf).
4. Muñoz D. K, Londoño L. J, Arango A. GJ, Sierra R. JA, Bravo M. KE. Efecto de la técnica de extracción de Ruta graveolens sobre la actividad antitirosinasa y correlación entre la inhibición enzimática, el contenido de compuestos fenólicos y la citotoxicidad. VITAE. [Online]. Medellín: Universidad de Antioquia, Colombia; 2007; 14(2): p. 78-83. [cited 2023 Abril. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815389009.pdf>.
5. Maureen Hernández Á, Prieto Gónzales E. Plantas que contienen Polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. Revista cubana de investigaciones médicas. [Online]. La Habana - Cuba; 1999; 18(1): p. 12-14. [cited 2023 Mayo. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001999000100004#:~:text=Rabo%20de%20gato%2C%20ginseng%2C%20gin%20kgo.%2C%20agrimonia%2C%20cal%C3%A9ndula%20y%20avena.
6. Gómez-Mejía E, Rosales-Conrado N, León-González ME, Madrid Y. Residuos de cáscaras de cítricos como fuente de compuestos de valor añadido: Extracción y cuantificación de polifenoles bioactivos.[Citrus peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols]. [Online].; 2019;295: p. 289-299 [cited 2024. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31174761/>.

7. Antunes Maciel A, Dal Piva EC, Pinheiro Lima G, Neves Serpa ECdS. Tratamiento de control del melasma [Tratamiento para controle de melasma] Anales en salud colectiva [Anais em saúde coletiva]. [Online].: Unidad Central de educación Facultad Faem [Unidade Central de Educação Faem Faculdade] UCEFF; 2022; 2(1): p. 40-42. [cited 2023 Mayo. Available from: <https://uceff.edu.br/anais/index.php/SAUDECOLET/article/download/487/492>.
8. Pérez Rivera F. Tratamiento de lesiones pigmentarias melanocíticas con láser Q-SWITCHED de picosegundos. [Online].; 2021 [cited 2023 Mayo. Available from: https://www.perezrivera.com/noticias/photo/1628167526c09%20Picosegundos%20F_Perez%20v2.pdf.
9. Aguilar García KF, Vargas Rojas AM, Vidarte Orrego G. Tratamiento en melasma. Revista oficial de la sociedad peruana de dermatología (SPD). [Online].: Dermatol Perú; 2021; 31(4): p. 281-289 [cited 2023 Mayo. Available from: https://www.dermatolperu.org/assets/uploads/revista/lf1n_01_Articulo_revision_3_1-4_compressed.pdf.
10. Dirección del Programa Técnico en Maquillaje Artístico y Coordinación de Investigación. Historia del maquillaje, de los orígenes hasta la profesionalización del oficio. [Online].; 2021 [cited 2023 Mayo. Available from: https://www.lci.edu.co/-/media/images/responsive/colombia/documentos/investigacion/2021/historia-del-maquillaje-de-sus-origenes-a-su-profesionalizacin_compressed.ashx?la=es-mx&hash=F679085B8099057459874D29CC19F95DC522E1A2.
11. Casañola Martín GM, Marrero Ponce Y, Le Thi Thu H, Hassan Khan MT, Torrens F, Rescigno A, et al. La enzima tirosinasa: 2. Inhibidores de origen natural y sintético. Afinidad IQS. [Online].; 2013; 70(564): p. 270-276 [cited 2023 Abril. Available from: <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/273744>.
12. Itoh K, Hirata N, Masuda M, Naruto S, Murata K, Wakabayashi K, et al. Efectos inhibidores del extracto de Citrus hassaku y sus glucósidos de flavanona sobre la melanogénesis. [Inhibitory effects of Citrus hassaku Extract and its flavanone glycosides on Melanogenesis]. Boletín biológico y farmacéutico. [Online].; 2009; 32(3) p. 410-415 [cited 2023 Julio. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/32/3/32_3_410/article/-char/ja/.
13. Lou SN, Yu MW, Ho CT. Componentes inhibidores de la tirosinasa en la cáscara de calamondina inmadura [Tyrosinase inhibitory components of immature

- calamondin peel]. Food chemistry. [Online].; 2012; 135(3): p. 1091-1096. [cited 2023 Julio. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.062>.
14. Zang C, Lu Y, Tao L, Tao X, Su X, Wei D. Efectos inhibidores de tirosinasa y mecanismos de inhibición de nobiletina y hesperidina de extractos crudos de cáscara. [Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts]. [Online].; 2007; 22(1): p. 83-90 [cited 2023 Julio. Available from: <https://doi.org/10.1080/14756360600953876>.
 15. Sasaki K, Yoshizaki F. Nobiletina como inhibidor de la tirosinasa de la cáscara de cítricos. [Nobiletin as a tyrosinase inhibitor from the peel of Citrus fruit]. Biological and Pharmaceutical Bulletin. [Online].; 2002; 25(6): p. 806-808 [cited 2023 Abril. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/25/6/25_6_806/article-char/ja/.
 16. Huanca-Huirse NL, Roque-Roque S, Laurel-Vargas VN, Quispe-Sancho AW. Percepción del riesgo de cancer de piel en un hospital de altura. Revista de la Facultad de Medicina Humana URP. [Online].; 2020; 20(2): p. 222-226. [cited 2024. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2308-05312020000200222&script=sci_abstract.
 17. Ramos Rodríguez C, Ramos M. Factores de riesgo para la ocurrencia de melasma en pacientes de un hospital de referencia. Dermatol Perú. [Online].; 2013; 23(1): p. 26-30 [cited 2023 Agosto. Available from: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/dermatologia/v23_n1/pdf/a03v23n1.pdf.
 18. Rodriguez Bueno de Macedo J. Fisiopatología del melasma [Fisiopatología do melasma]. [Online].; 2019 [cited 2023 Agosto. Available from: https://www.academia.edu/download/60723983/TCC_-_Juliana_Rodrigues_Bueno_de_Macedo_-_SPO3520190927-67770-10e3aly.pdf.
 19. Saginala K, Barsouk A, Sukumar Aluru J, Rawla P, Barsouk A. Epidemiología del melanoma [Epidemiology of Melanoma]. Medical Sciences. [Online].: MDPI; 2021; 9(63) [cited 2023 Mayo. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3271/9/4/63>.
 20. Alqathama A, Yonbawi AR, Shao L, Bader A, Abdalla AN, Gibbons S, et al. La citotoxicidad in vitro contra las células del melanoma humano, la inhibición de la tirosinasa y la actividad antioxidante de los extractos de hojas de Grewia tenax. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.

- [Online].; 2023; 22(2): p. 268-276 [cited 2023 Mayo. Available from: <https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/338/346>.
21. Colombo A. Cultivar Los cítricos ornamentales y de fruto. 1er ed. USA: Editorial de Vecchi, S. A. U.; 2020.
 22. Avalos Viveros M. Evaluación del Extracto Etanólico y de Fracciones Obtenidas por Carbonización Hidrotérmica Procedentes del Epicarpio de Frutos de Aguacate (*Persea americana* Mill. cultivar Hass) Sobre Marcadores de Envejecimiento Celular Cutáneo. [Online]. Morelia; 2022 [cited 2023 Abril. Available from: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/6745.
 23. Luque Alcaraz AG, Velázquez Antillón M, Hernández Téllez N, Graciano Verdugo AZ, García Flores N, Irique Razcón L, et al. Antioxidant effect of nanoparticles composed of zein and orange (*Citrus sinensis*) Extract obtained by ultrasound-assisted extraction. [Online].; 2022; 15(14). [cited 2023 Abril. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/14/4838>.
 24. Anticona-Barreto ML. Compuestos Bioactivos y capacidad antioxidante en zumos y extractos de residuos, obtenidos por ultrasonidos, de mandarinas híbridas. Valencia: Universidad de Valencia. [Online]. Valencia: Universidad de Valencia; 2022 [cited 2024. Available from: <https://webges.uv.es/public/uvEntreuWeb/tesis/tesis-1996599-DCD9G8DM16ID2CUJ.pdf>.
 25. Ilyas H, Hanif U, Ali A, Tarar H, Javed H, Tahir T, et al. Potencial Anti-tirosinasa y Antioxidante del Extracto Metanólico de Partes Seleccionadas de *Citrus bergamia* y *Ficus carica* [Anti-tyrosinase and Anti-oxidant Potential of Methanolic Extracts of Selected *Citrus bergamia* and *Ficus carica* Parts]. [Online].; 2021; 27(4): p. 443-450 [cited 2023 Abril. Available from: https://www.academia.edu/111836086/Anti_Tyrosinase_and_Anti_Oxidant_Potential_of_Methanolic_Extracts_of_Selected_Citrus_Bergamia_and_Ficus_Carica_Parts.
 26. Delgado Zambrano MG. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de los Extractos Alcohólico y Acuoso de la Cáscara de la Mandarina (*Citrus reticulata*), en Relación a un Medicamento Comercial. Universidad Politécnica Salesiana sede cuenca.

- Ecuador. [Online].; 2020 [cited 2023 Abril. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18542/4/UPS-CT008714.pdf>.
27. Navia A, Ormachea P, Salcedo L, Lozano M, Tarqui S, Flores Y, et al. Determination of the phenolic contents, and evaluation of the antityrosinase activity, and the antioxidant indexes of four bolivian quinoa varieties. [Online].; 2020; 37(1): p. 12-20. [cited 2023 Abril. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426363282002>.
28. Mera Santa Cruz E, Papuico Sanchez LE. Actividad Anti-tirosinasa y efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de Phaseolus vulgaris L. Ñuña roja y negra. Universidad Norbert Wiener. Lima. [Online].; 2020 [cited 2023 Abril. Available from: https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/4246/T061_482_80008_47401607_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
29. Condo Ramirez ME, Quispe del Campo JM. Efecto anti-tirosinasa de extractos metanólico y etil acetato del epicarpio de Citrus sinensis (L.) Osbeck Var. huando (naranja). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. [Online].; 2019 [cited 2023 Abril. Available from: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11311/Condo_rm.pdf?sequence=3.
30. Ordoñez Gomez ES, Reátegui Díaz D, Villanueva Tiburcio JE. Polifenoles Totales y Capacidad Antioxidante en Cáscara y Hojas de Doce Cítricos. Scientia Agropecuaria. [Online].; 2018; 9(1): p. 113-121. [cited 2023 Abril. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v9n1/a12v9n1.pdf>.
31. Marreros Castañeda SH. Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante d elas flores de Citrus sinensis (naranja), Citrus aurantifolia (lima) y Prunus persica (durazno); Chimbote: Universidad Católica los Ángeles de Chiumbote. [Online]. Chimbote; 2018 [cited 2023 Mayo. Available from: <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/21087>.
32. Cruz Mamani XE. Determinación de la acción in vitro del extracto metanólico de cedrón (Lippia citriodora) sobre células de melanoma inhibiendo la melanogénesis y sobre la actividad in vitro de la enzima tirosinasa sobre el sustrato L-tirosina.

[Online].; 2017 [cited 2023 Abril. Available from:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-912229?lang=es>.

33. Del Castillo Ttito K. Actividad inhibitoria in vitro sobre la enzima tirosinasa y actividad antioxidante del extracto metanólico de *Origanum vulgare* L. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2024.
34. Urrunaga Ormachea M, del Carpio Jiménez C, Gutierrez Chavez RG, Tomaylla Cruz C. Propiedades Físicoquímicas, Composición Química y Actividad Antioxidante del Aceite Esencial de *Citrus jambhiri* (Limón rugoso). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. [Online].; 2023; 88(3): p. 277-288 [cited 2023 Abril. Available from:
<http://revistas.sqperu.org.pe/index.php/revistasqperu/article/view/403/345>.
35. Alarcón-Mite AI, Mora-Loor JL, Cabrera-Casillas O, García-Larreta FS. Estudio Comparativo de la Composición Química, Fenoles totales y Actividad antioxidante de *Citrus sínensis*, *Citrus reticulata* y *Citrus máxima*; *Reciamuc*. [Online].: Saberes del Conocimiento; 2022; 6(3): p. 535-545. [cited 2024. Available from:
<https://reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/941>.
36. Priyadarshi S, Kashyap P, Gadhawe RK, Jindal N. Efecto de la hidrodestilación asistida por ultrasonido sobre cinética de extracción, la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de cáscara de *Citrus jambhiri*. *Journal of Food Process Engineering*. [Online].; 2021; 44(12) [cited 2024. Available from:
<https://doi.org/10.1111/jfpe.13904>.
37. Nadear-Escasia S. Aktivitas antibakteri minyak atsiri kulit buah jeruk jungga (*Citrus jambhiri* Lush.) terhadap bakteri isolat klinis *Staphylococcus epidermidis*. [Online].: Repositorio Institucional de la Universidad Sumatra del Norte; 2023 [cited 2024. Available from: <https://repositori.usu.ac.id/handle/123456789/85389>.
38. Mabberley DJ. Una clasificación para los cítricos comestibles (Rutaceae) [A classification for edible *Citrus* (rutaceae)]; *Telopea*. [Online].; 1997; 7(2) [cited 2023 Mayo. Available from:
http://citruspages.free.fr/A_classification_for_edible_Citrus.pdf.
39. León J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. 1er ed. San Jose: Editorial IICA; 1968.

40. Cebrían-Ortega A. Influencia del método de extracción en la composición del aceite esencial de la corteza de Citrus jambhiri, Citrus hystrix y Citrus Limon; Universidad Politécnica de Valencia. [Online]. Valencia; 2021 [cited 2024. Available from: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/173857/Cebrian%20-%20Influ%C3%A8ncia%20del%20m%C3%A8tode%20d'extracci%C3%B3%20en%20la%20composici%C3%B3%20de%20l'oli%20essencial%20de%20la%20corfa%20de%20citrr.pdf?sequence=3>.
41. Beltran-Huertas JA, Natagaima-Lopez A. Efecto insecticida de Citrus jambhiri Lush sobre Trialeurodes vaporariorum en condiciones de laboratorio; Bogota: Universidad de Bogota Jorge Tadeo Lozano. [Online]. Bogota: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 2018 [cited 2024. Available from: <http://hdl.handle.net/20.500.12010/4308>.
42. Calderón-González JM. Estudio etnobotánico de las frutas comestibles comercializadas en las ferias locales de la Amazonía Ecuatoriana; El coca. [Online]. El Coca; 2023 [cited 2024. Available from: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/19045>.
43. García-Dorado J, Alonso-Fraile P. Anatomía y fisiología de la piel; Pediatría Integral. [Online].; 2021; XXIV(3): p. 156.e1-156.e13 [cited 2024. Available from: https://pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2021/xxv03/07/n3-156e1-13_RB_JesusGarcia.pdf.
44. Sepúlveda-Saavedra J. Texto atlas de Histología, Biología Celular y Tisular. 2nd ed.: Interamericana Editores. [Online].: Interamericana Editores; 2014 [cited 2024. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1506>.
45. Carranza EE, Carranza Gajardo EA. Anatomía de la piel; Cilad. Org. [Online].; 2009; 1(23) [cited 2023 Mayo. Available from: <https://antoniorondonlugo.com/wp-content/uploads/2010/05/157-ANATOMIA-DE-LA-PIEL.pdf>.
46. Honeyman J. Fisiología de la piel; Dermatología Iberoamericana On line. [Online].; 2013 [cited 2023 Mayo. Available from: <https://www.academia.edu/download/57761583/178-FISIOLOGIA-DE-LA-PIEL2.pdf>.

47. Estrada D. Desarrollo sistema tegumentario UDocz. [Online].; 2019 [cited 2024]. Available from: <https://www.udocz.com/apuntes/312846/desarrollo-de-sistema-tegumentario>.
48. Bologna J, Schaffer J, Cerroni L. Dermatología. Cuarta edición ed.; 2018.
49. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Melanocitos de la piel. Biología y desarrollo [Skin melanocytes: biology and development]; Advances en Dermatology and Allergology. [Online].; 2013; 20; 30(1): p. 30-41 [cited 2024]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3834696/#:~:text=The%20life%20cycle%20of%20melanocytes,production%20in%20special%20organelles%20%E2%80%93%20melanosomes%2C>.
50. Avilés A, Lázaro P. Predisposición genética en el melanoma cutáneo. [Online]. Madrid: Hospital General Universitario Gregorio Marañón; 2006; 97(4): p. 229-240 [cited 2023 Mayo. Available from: <https://www.actasdermo.org/es-pdf-13089327>.
51. López-Nicolás JM, García-Carmona F. Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática; Revista Eubacteria. [Online].; 2015; (34): p. 39-43 [cited 2024]. Available from: <https://hdl.handle.net/10201/48171>.
52. Khan Academy. Fundamentos de las gráficas de cinética enzimática. [Online]. [cited 2024. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/environmental-impacts-on-enzyme-function/a/basics-of-enzyme-kinetics-graphs>.
53. Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo; Revista cubana de medicina militar. [Online].: Scielo; 2001; 30(1): p. 15-20 [cited 2023 Mayo. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572001000100007.
54. Llinares Grau M. Propiedades antioxidantes de mieles de Mozambique en base a su composición en flavonoides y ácidos fenólicos; Universidad Politécnica de Valencia. [Online].; 2021-2022 [cited 2023 Mayo. Available from: <http://hdl.handle.net/10251/184964>.
55. Londoño Londoño JA. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad; Corporación Universitaria Lasallista. [Online].: Corporación

- Universitaria Lasallista; 2012; p. 129-163 [cited 2023 Mayo. Available from: <http://hdl.handle.net/10567/133>.
56. Ruiz Benitez ML. Determinación de la actividad antioxidante; Universidad Simón Bolívar. [Online]. Barranquilla y Cucuta; 2020 [cited 2023 Mayo. Available from: <http://bonga.unisimon.edu.co/handle/20.500.12442/7986>.
57. Rubio Garcia J. Extracción de compuestos bioactivos mediante pre-tratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas. Valorización del raspón de uva; Repositorio Documental de la universidad de Valladolid. [Online]. Valladolid-España: Universidad de Valladolid; 2018 [cited 2023 Mayo. Available from: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/32083/TFG-G3026.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
58. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales; Segunda edición ed. Lima: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. [Online]. Lima: Fondo Editorial de la pontificia Universidad Católica del Perú; 1994 [cited 2023 Abril. Available from: <https://books.google.com.pe/books?id=N36g2QOccXkC&printsec=frontcover&#v=onepage&q&f=false>.
59. García Martínez E, Fernández Segovia I, Fuentes López A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Artículo Docente. Universidad Politécnica de Valencia. [Online].: Universitat Politècnica de València; 2015 [cited 2023 Mayo. Available from: <http://hdl.handle.net/10251/52056>.
60. Barrientos-Bonilla AA, Zavala-Flores LM, Hernández-Baltazar D. Modelos biológicos en investigación biomédica: características e implicaciones; Revista de educación en ciencias e ingeniería. [Online].; 2023; (128): p. 43-51 [cited 2024. Available from: <https://contactos.izt.uam.mx/index.php/contactos/article/view/272>.
61. Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico?; Actualizaciones en Osteología. [Online].; 2013; 9(3): p.239-240 [cited 2024. Available from: <http://www.osteologia.org.ar>.
62. Maldonado Saavedra O, Jiménez Vásquez EN, Guapillo Vargas MRB, Ceballos Reyes GM, Méndez Bolaina E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas; Revista Médica. Universidad Veracruzana. [Online].; 2010;

p.239-240 [cited 2023 Mayo. Available from:
<http://reini.utcv.edu.mx/handle/123456789/876>.

63. Gutiérrez PA, Rojano BA. Docking de cicloartanos inhibidores de tirosinasa; Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. [Online]. Medellín: Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; 2009; 16(2): p.245-251 [cited 2023 Mayo. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n2/v16n2a09.pdf>.
64. MERCK. Boletín técnico, Kit de Cribado de Inhibidores de la Tirosinasa MAK257. [Online].; 2016 [cited 2023. Available from: sigma-aldrich.com.
65. Sharapin N, Machado Rocha L, Souza Carvalho E, Rocha E, Valverde E, Lopez J. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos; Primera edición ed. Colombia: Secretaria ejecutiva del Convenio Andres Bello (SECAB). [Online].: Secretaria Ejecutiva del Convenio Andres Bello (SECAB); 2000 [cited 2023 Junio. Available from:
<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=XH2HzSIJPywC&oi=fnd&pg=PA13&ots=iVvtM-RHyn&sig=8iVyYEXorMhCFP621jd4laT55B4>.
66. Figueroa-Bastidas VL. Remoción de clorofilas como interferencias analíticas de una muestra vegetal. [Online].; 2022 [cited 2024. Available from:
<https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/45fc8236-8384-47d7-acb7-c21638b9116e>.
67. Aguilar-Molina S. Evaluación del efecto del tratamiento con carbón activo en la composición de polifenoles durante la eliminación de clorofilas en extractos de plantas. [Online].; 2018 [cited 2024. Available from:
<https://crea.ujaen.es/items/3664b929-f68d-48e5-b93e-f77e74d7bf2c>.
68. Muñoz-D. K, Londoño-L. JA, Arango-A. GJ, Sierra-R. JA, Bravo-M. KE. Efecto de la técnica de extracción de Ruta graveolens sobre la actividad antitirosinasa y correlación entre la inhibición enzimática, el contenido de compuestos fenólicos y la citotoxicidad. [Online]. Medellín; 2007; 14(2). [cited 2024. Available from:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042007000200010.
69. De-Arriaga D, Soler J, Busto F, Cadenas E. Cinética enzimática: Manejo de datos; Universidad de Oviedo. [Online].; 1979 [cited 2024. Available from:
https://www.google.com.pe/books/edition/Cin%C3%A9tica_enzim%C3%A1tica/id

[8WZfV NSIC?hl=es-419&qbpv=1&dq=cinetica+de+la+inhibici%C3%B3n+enzimatica&printsec=frontcover](https://books.google.com.mx/books?hl=es-419&qbpv=1&dq=cinetica+de+la+inhibici%C3%B3n+enzimatica&printsec=frontcover).

70. Melo V, Cuamatzi O. Bioquímica de los procesos metabólicos. 2nd ed.: Reverte. [Online].: Reverte; 2007 [cited 2024. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=KHec9weY8Y0C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.
71. Apaza-LLamocca N, Huamani-Huayhua L. Actividad antioxidante, cuantificación de polifenoles y flavonoides y control fisicoquímico y microbiológico de soluciones orales de propóleos expendidos en casas naturistas del distrito del Cusco Perú: Repositorio Institucional UNSAAC; 2023.
72. Montenegro-Landívar MF, Tapia-Quirós P, Vecino X, Reig M, Valderrama C, Granados M, et al. Recuperación de compuestos de valor agregado de los residuos del procesamiento de naranjas y espinacas: Extracción verde de compuestos fenólicos y evaluación de la actividad antioxidante. *Antioxidants*. [Online]. Barcelona; 2021; 10(1800). [cited 2024. Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox10111800>.
73. Pérez-Najera VC, Lugo-Cervantes EC, Gutiérrez-Lomelí M, Del-Toro-Sánchez CL. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de Lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnia*. [Online].; 2013; 15(3). p. 18-22 [cited 2024. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/6729/672971124003.pdf>.

ANEXOS

ANEXO 1 Certificación de la especie en estudio *Citrus jambhiri* Lush.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- MUSEO INKA
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N°03-2024-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas CUZ, Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), certifica que las señoritas **Keyly Denisa Cahuana Mendoza**, con código de estudiante N°155552 y, **Elisa Blanca Morales Quispiño**, con código de estudiante N° 141745; estudiantes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la **Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco**, presentaron a la Dirección del Herbario Vargas CUZ, una muestra botánica para su determinación y certificación taxonómica (Expediente N° 594030), para el proyecto de tesis "**Determinación In Vitro de la Actividad Anti-Tirosinasa y Actividad Antioxidante de la Fracción Clorofórmica del Extracto Hidrometanólico elaborado a partir del Epicarpio de los Frutos de *Citrus jambhiri* Lush. (Limón rugoso)**", la que al ser diagnosticada por el M.Sc. Manuel Jesús Marca Zevallos, utilizando claves dicotómicas, consulta de bibliografía especializada y, comparación con las colecciones del herbario, concuerda con la siguiente especie; de acuerdo a la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group - APG IV, 2016).

| N° | FAMILIA | ESPECIE | NOMBRE LOCAL |
|----|----------|------------------------------|----------------|
| 1 | Rutaceae | <i>Citrus jambhiri</i> Lush. | "limón rugoso" |

Cusco, 08 de febrero de 2024


Blga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas CUZ



ANEXO 2 Ficha de recolección de datos para determinar el porcentaje de rendimiento

| | PESO (g) |
|---|----------|
| Peso de epicarpio seco triturado correspondiente a 200 limones rugosos. | |
| Peso del extracto seco hidrometanólico | |
| Porcentaje de extracción hidrometanólica | |
| Peso de la fracción clorofórmica del extracto seco hidrometanólico | |
| Porcentaje de extracción final | |

ANEXO 3 Ficha de recolección de datos para realizar el análisis fitoquímico cualitativo

| METABOLITO SECUNDARIO | REACTIVO | RESULTADO |
|------------------------------|----------|-----------|
| Flavonoides | | |
| Compuestos fenólicos | | |
| Quinonas | | |
| Taninos | | |
| Azúcares reductores | | |
| Lactonas sesquiterpénicas | | |
| Saponinas | | |
| Identificación de alcaloides | | |

ANEXO 4 Ficha de recolección de datos para la cuantificación de compuestos fenólicos en la especie en estudio *Citrus jambhiri* Lush.

🚦 Para la curva patrón de ácido gálico

| CONCENTRACIÓN
ÁCIDO GÁLICO (µg/mL) | ABSORBANCIA
765 nm
(tres lecturas) | PROMEDIO DE
LAS LECTURAS |
|---------------------------------------|--|-----------------------------|
| 1 | | |
| | | |
| | | |
| 50 | | |
| | | |
| | | |
| 100 | | |
| | | |
| | | |
| 200 | | |
| | | |
| | | |

✚ Para la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos *citrus jambhiri* Lush.

| MUESTRA ($\mu\text{g/mL}$) | ABSORBANCIA 765nm | PROMEDIO DE LAS LECTURAS |
|------------------------------|-------------------|--------------------------|
| 100 | | |
| | | |
| | | |

ANEXO 5: Ficha de recolección de datos para la actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima tirosinasa de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush.

✚ para el patrón ácido kójico

| Tiempo | CONCENTRACIÓN
ÁCIDO KÓJICO
(mM) | ABSORBANCIA (510 nm) |
|--------|---------------------------------------|----------------------|
| 0 min | 1 | |
| | 3 | |
| | 5 | |
| 10 min | 1 | |
| | 3 | |
| | 5 | |
| 20 min | 1 | |
| | 3 | |
| | 5 | |
| 30 min | 1 | |
| | 3 | |
| | 5 | |
| 40 min | 1 | |
| | 3 | |
| | 5 | |
| 50 min | 1 | |
| | 3 | |
| | 5 | |
| 60 min | 1 | |
| | 3 | |
| | 5 | |

✚ Para la muestra en estudio

| Tiempo | CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA
($\mu\text{g/mL}$) | ABSORBANCIA (510 nm) | | |
|--------|---|----------------------|----------|----------|
| | | Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 |
| 0 min | 25 | | | |
| | 50 | | | |
| | 100 | | | |
| | 250 | | | |
| | 500 | | | |
| 10 min | 25 | | | |
| | 50 | | | |
| | 100 | | | |
| | 250 | | | |
| | 500 | | | |
| 20 min | 25 | | | |
| | 50 | | | |
| | 100 | | | |
| | 250 | | | |
| | 500 | | | |
| 30 min | 25 | | | |
| | 50 | | | |
| | 100 | | | |
| | 250 | | | |
| | 500 | | | |
| 40 min | 25 | | | |
| | 50 | | | |
| | 100 | | | |
| | 250 | | | |
| | 500 | | | |
| 50 min | 25 | | | |
| | 50 | | | |
| | 100 | | | |
| | 250 | | | |
| | 500 | | | |
| 60 min | 25 | | | |
| | 50 | | | |
| | 100 | | | |
| | 250 | | | |
| | 500 | | | |

ANEXO 6: Ficha de recolección de datos para determinar la capacidad antioxidante por el método DPPH de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush.

✚ Para la curva patrón

| CONCENTRACIÓN TROLOX (µg/mL) | ABSORBANCIA 517 nm (tres lecturas) | PROMEDIO DE LAS LECTURAS |
|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 3.125 | | |
| | | |
| | | |
| 6.25 | | |
| | | |
| | | |
| 12.5 | | |
| | | |
| | | |
| 25 | | |
| | | |
| | | |
| 50 | | |
| | | |
| | | |

✚ Para la muestra

| CONCENTRACIÓN Muestra (µg/mL) | ABSORBANCIA 517 nm (tres lecturas) | PROMEDIO DE LAS LECTURAS |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 62.5 | | |
| | | |
| | | |
| 125 | | |
| | | |
| | | |
| 250 | | |
| | | |
| | | |

ANEXO 7: Ficha de recolección de datos para determinar la actividad antioxidante por el método ABTS de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico del epicarpio de los frutos de *Citrus jambhiri* Lush.

✚ Para la curva patrón

| CONCENTRACIÓN TROLOX (µg/mL) | ABSORBANCIA 734 nm (tres lecturas) | PROMEDIO DE LAS LECTURAS |
|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 3.125 | | |
| | | |
| | | |
| 6.25 | | |
| | | |
| | | |
| 12.5 | | |
| | | |
| | | |
| 25 | | |
| | | |
| | | |
| 50 | | |
| | | |
| | | |

✚ Para la muestra

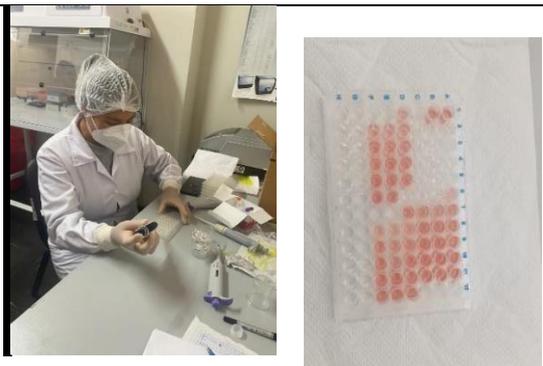
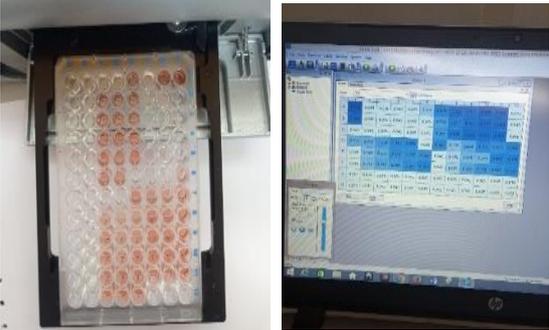
| CONCENTRACIÓN Muestra (µg/mL) | ABSORBANCIA 734 nm (tres lecturas) | PROMEDIO DE LAS LECTURAS |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 31.25 | | |
| | | |
| | | |
| 62.5 | | |
| | | |
| | | |
| 125 | | |
| | | |
| | | |

ANEXO 8 Registro fotográfico

| | |
|---|--|
| <p>Fotografía N° 1:</p> | <p>Fotografía N° 2</p> |
|  |  |
| <p>CC.PP Toctohuaylla, distrito de Huanoquite, Provincia de Paruro, Región Cusco.</p> | <p>Recolección de los frutos</p> |
| <p>23Fotografía N° 3</p> | <p>Fotografía N° 4</p> |
|  |  |
| <p>Extracción del epicarpio de los frutos de <i>Citrus Jambhiri</i> Lush.</p> | <p>Pulverización de la muestra seca</p> |
| <p>Fotografía N° 5</p> | <p>Fotografía N° 6</p> |
|  |  |
| <p>Maceración de las muestras vegetales secas</p> | <p>Filtrado</p> |

| | |
|---|--|
| Fotografía N° 7 | Fotografía N° 8 |
|  |  |
| Evaporación | Peso del extracto seco hidrometanólico |

DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA

| | |
|---|---|
| Fotografías N° 9, 10 Y 11 | |
|  | |
| Kit de cribado de inhibidores de la tirosinasa (MAK257 Sigma-Aldrich) | |
| FOTOGRAFÍAS N°12 Y 13: | FOTOGRAFÍAS N°14 Y 15: |
|  |  |
| Preparación en los pocillos para el ensayo Anti-tirosinasa. | Lectura en el espectrofotómetro a 510 nm siguiendo el modelo cinético cada 10 minutos durante 60 minutos. |

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Preparación del reactivo DPPH

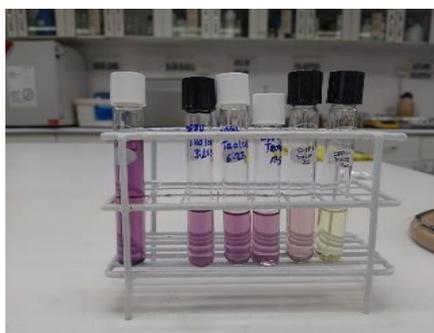
Fotografías N° 16 Y 17



Reactivos

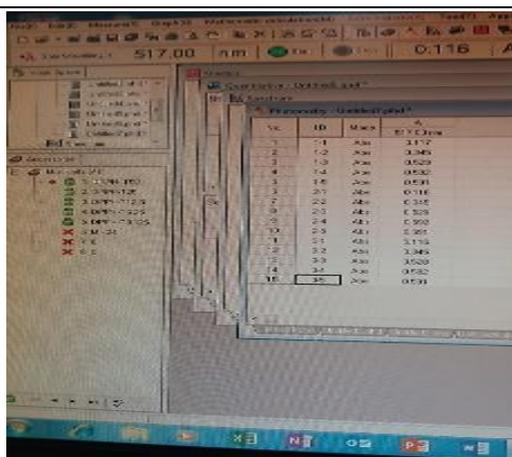
Radical DPPH

Fotografía N°18



Viraje de coloración con el patrón trolox

Fotografía N°20



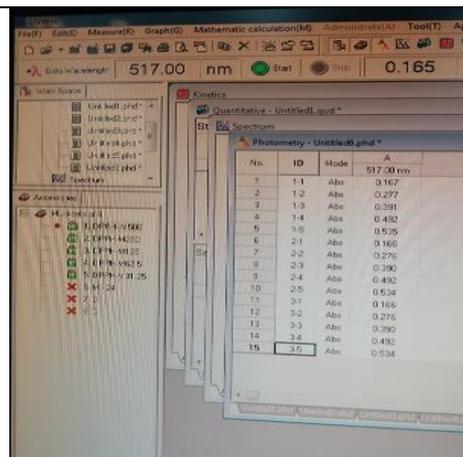
Resultados de las absorbancias para el patrón trolox

Fotografía N°19

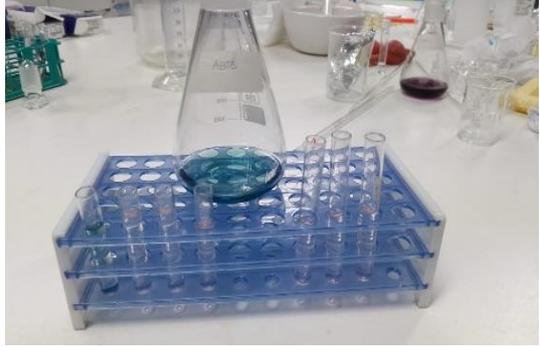
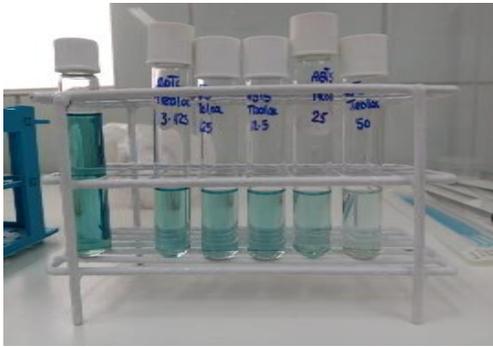
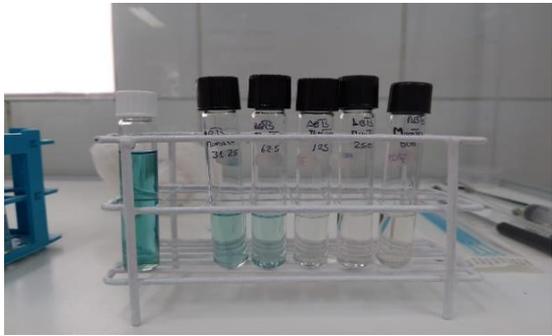
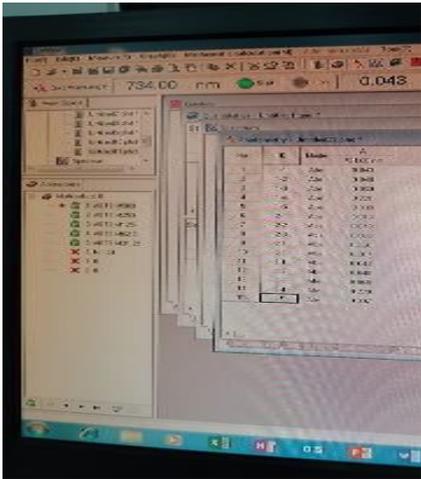
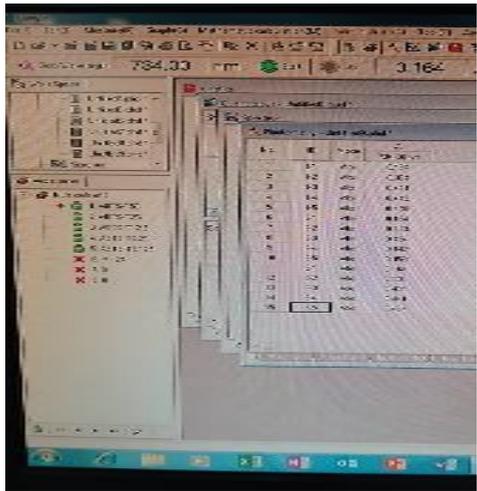


Viraje de coloración con la muestra en estudio

Fotografía N°21



Resultados de las absorbancias para las muestras.

| Preparación del reactivo ABTS | |
|---|--|
| Fotografía N°22 | Fotografía N°23 |
|  |  |
| Reactivos | Preparación de la curva patrón de trolox |
| Fotografía N°24 | Fotografía N°25 |
|  |  |
| Viraje de coloración para el patrón trolox | Viraje de coloración para la muestra |
| Fotografía N°26 | Fotografía N°27 |
|  |  |
| Resultados de las absorbancias para el patrón trolox. | Resultados de las absorbancias para las muestras. |

DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS POR EL MÉTODO Folin-Ciocalteu

Reparación del reactivo de Folin-Ciocalteu de la fracción clorofórmica del extracto hidrometanólico

Fotografía N°28



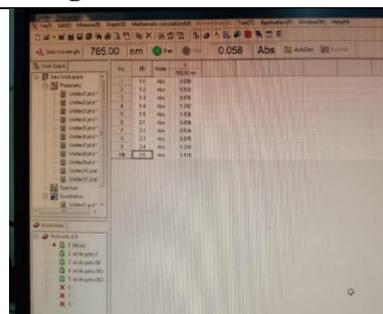
Reactivo

Fotografía N°29



Curva patrón de ácido gálico

Fotografía N°30



Resultados de la absorbancias

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN FITOQUÍMICA EN LA FRACCIÓN CLOROFÓRMICA DEL EXTRACTO HIDROMETANÓLICO.

Fotografía N°31



Fotografía N°33



Fotografía N°33



Viraje de coloración en la pruebas de identificación fitoquímica

Product Information

Tyrosinase Inhibitor Screening Kit (Colorimetric)

Catalog Number **MAK257**
 Storage Temperature $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

Tyrosinase or polyphenol oxidase (EC 1.14.18.1) is an oxidoreductase that participates in the biosynthesis of melanin, a ubiquitous biological pigment found in hair, eyes, skin, etc. Inhibition of tyrosinase has been a long-time target in the skin health research, cosmetics, and agricultural industries because of its role in browning reactions in skin pigmentation, and during fruit harvesting and handling. Skin whitening and bleaching products utilize natural or synthetic tyrosinase inhibitors in order to lighten the skin color. Polyphenols, benzaldehyde derivatives, long-chain lipids, steroids, and natural compounds have been used as tyrosinase inhibitors.

Tyrosinase catalyzes the oxidation of tyrosine, producing a chromophore that can be detected at 510 nm. In the presence of kojic acid, a reversible inhibitor of tyrosinase, the rate of oxidation of the substrate is decreased. The kit provides a rapid, simple, sensitive, and reliable test suitable for high-throughput screening of tyrosinase inhibitors. The assay is also adaptable to a 384 well format.

Components

The kit is sufficient for 100 assays in 96 well plates.

| | |
|--|--------|
| Tyrosinase Assay Buffer
Catalog Number MAK257A | 25 mL |
| Tyrosinase Substrate
Catalog Number MAK257B | 1 vial |
| Tyrosinase
Catalog Number MAK257C | 1 vial |
| Tyrosinase Enhancer
Catalog Number MAK257D | 0.5 mL |
| Inhibitor Control (Kojic Acid)
Catalog Number MAK257E | 1 vial |

Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- 96 well flat-bottom clear plate
- Spectrophotometric multiwell plate reader

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

Briefly centrifuge small vials prior to opening. Use ultrapure water for the preparation of reagents.

Tyrosinase Substrate – Dissolve the lyophilized tyrosinase substrate in 220 μL of water. Use within two months. Keep on ice while in use.

Tyrosinase – Dissolve the lyophilized tyrosinase in 220 μL of Tyrosinase Assay Buffer. Aliquot and store at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze/thaw cycles. Use within two months. Keep on ice while in use.

Tyrosinase Enhancer – Ready to use. Protect from light. Keep at room temperature while in use.

Inhibitor Control (Kojic Acid) – Add 75 μL of water to make a 10 mM Stock Solution of Kojic Acid. Mix well. Make a 0.75 mM Working Solution of Kojic Acid by adding 92.5 μL of water to 7.5 μL of the prepared 10 mM Kojic Acid Stock solution. Use within two months.

Storage/Stability

Store the kit at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protected from light. Briefly centrifuge small vials prior to opening.

Procedure

Read entire protocol before performing the assay.

Screening compounds, Inhibitor control and Blank Control Preparations

Dissolve test inhibitors into the proper solvent. Dilute to 5× the desired test concentration with Tyrosinase Assay Buffer before use. Add 20 µL of diluted test inhibitors, Inhibitor Control working solution, or Tyrosinase Assay Buffer into wells assigned as test inhibitors (Sample, S), Inhibitor Control (IC), or Tyrosinase Enzyme Control (EC) wells, respectively. Additional wells with serial dilutions of the test inhibitors may be prepared at this time if desired, containing 20 µL in each candidate well.

Note: Preferred final solvent concentration should not be more than 5% by volume. If solvent exceeds 5% include a Solvent Control to test the effect of the solvent on enzyme activity.

Tyrosinase Enzyme Solution Preparation

For each well, prepare 50 µL of Tyrosinase Enzyme Solution, see Table 1.

Table 1.

Preparation of Tyrosinase Enzyme Solution

| Reagent | Volume |
|-------------------------|--------|
| Tyrosinase Assay Buffer | 48 µL |
| Tyrosinase | 2 µL |

Mix well and add 50 µL/well into wells containing test inhibitors, Inhibitor Control, and Enzyme Control. Mix. Incubate for 10 minutes at 25 °C.

Tyrosinase Substrate Solution Preparation

For each well, prepare 30 µL of Tyrosinase Substrate Solution, see Table 2.

Table 2.

Preparation of Tyrosinase Substrate Solution

| Reagent | Volume |
|-------------------------|--------|
| Tyrosinase Assay Buffer | 23 µL |
| Tyrosinase Substrate | 2 µL |
| Tyrosinase Enhancer | 5 µL |

Mix and add 30 µL of Tyrosinase Substrate Solution into each well. Mix well.

Measurement

Measure the absorbance in kinetic mode for 30–60 minutes at 510 nm. Choose two time points (T_1 and T_2) in the linear range of the plot and obtain the corresponding values for the absorbance (Abs_1 and Abs_2).

ResultsCalculations

Calculate the slope for all samples, including Enzyme Activity Control (EC), by dividing the net ΔAbs ($Abs_2 - Abs_1$) values by the time ΔT ($T_2 - T_1$). Calculate % Relative Inhibition as follows:

$$\% \text{ Relative Inhibition} = [\text{Slope(EC)} - \text{Slope(S)}] / \text{Slope(EC)} \times 100$$

Troubleshooting Guide

| Problem | Possible Cause | Suggested Solution |
|--|---|--|
| Assay Not Working | Cold assay buffer | Assay Buffer must be at room temperature |
| | Omission of step in procedure | Refer and follow Technical Bulletin precisely |
| | Plate reader at incorrect wavelength | Check filter settings of instrument |
| | Type of 96 well plate used | Flat-bottom clear plates are preferred for this assay. |
| Samples with erratic readings | Samples prepared in different buffer | Use the Assay Buffer provided or refer to Technical Bulletin for instructions |
| | Cell/Tissue culture samples were incompletely homogenized | Repeat the sample homogenization, increasing the length and extent of homogenization step. |
| | Samples used after multiple freeze-thaw cycles | Aliquot and freeze samples if samples will be used multiple times |
| | Presence of interfering substance in the sample | If possible, dilute sample further |
| | Use of old or inappropriately stored samples | Use fresh samples and store correctly until use |
| Lower/higher readings in samples and standards | Improperly thawed components | Thaw all components completely and mix gently before use |
| | Use of expired kit or improperly stored reagents | Check the expiration date and store the components appropriately |
| | Allowing the reagents to sit for extended times on ice | Prepare fresh Reaction Mix before each use |
| | Incorrect incubation times or temperatures | Refer to Technical Bulletin and verify correct incubation times and temperatures |
| | Incorrect volumes used | Use calibrated pipettes and aliquot correctly |
| Non-linear standard curve | Use of partially thawed components | Thaw and resuspend all components before preparing the reaction mix |
| | Pipetting errors in preparation of standards | Avoid pipetting small volumes |
| | Pipetting errors in the Reaction Mix | Prepare a Reaction Mix whenever possible |
| | Air bubbles formed in well | Pipette gently against the wall of the plate well |
| | Standard stock is at incorrect concentration | Refer to the standard dilution instructions in the Technical Bulletin |
| | Calculation errors | Recheck calculations after referring to Technical Bulletin |
| | Substituting reagents from older kits/lots | Use fresh components from the same kit |
| Unanticipated results | Samples measured at incorrect wavelength | Check the equipment and filter settings |
| | Samples contain interfering substances | If possible, dilute sample further |
| | Sample readings above/below the linear range | Concentrate or dilute samples so readings are in the linear range |

SJ,MAM 04/16-1