



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*Caracterización de flavonoides naturales y semisintéticos
con acción inhibitoria sobre la actividad de la tirosinasa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JUANA KARLA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Federico Alfredo García Jiménez

VOCAL: Profesor: Eduardo Guillermo Delgado Lamas

SECRETARIO: Profesor: José Serafín Calderón Pardo

1er. SUPLENTE: Profesor: Martha Yolanda González Quezada

2° SUPLENTE: Profesor: Katia Solorzano Maldonado

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 7-C, PRODUCTOS NATURALES, INSTITUTO DE QUÍMICA, LABORATORIO 307, BIOQUÍMICA BÁSICA, EDIFICIO B, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ SERAFÍN CALDERÓN PARDO

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN

SUSTENTANTE (S): JUANA KARLA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

Este trabajo se realizó en el laboratorio 7-C del Instituto de Química y en el laboratorio 307 de Bioquímica Básica, edificio B de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. José S. Calderón Pardo, con el apoyo económico de una beca otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI)

Dedicatorias y agradecimientos

- *A mis asesores*

Dr. Calderón muchas gracias por todo el apoyo y su paciencia que me brindo durante todo el tiempo que estuve en el Instituto de Química.

M. en C. Luz del Carmen, gracias por que sin su ayuda no hubiera logrado este triunfo, porque con su paciencia y sabiduría lograron guiarme al final del camino.

- *A mi familia*

Gracias **Dios** porque por ti he concluido una etapa muy hermosa de mi vida, entraste como mi padre espiritual y nunca me has soltado de tu mano, este triunfo es tuyo, siempre estaré agradecida de ser una hija tuya.

Mami te amo mucho y te agradezco todo el apoyo que me has brindado desde que yo llegue a este mundo, porque a pesar de que mi papa nos abondo en el camino tu estuviste ahí para levantarnos a mis hermanos y a mí, eres una mujer extraordinaria, con grandes valores, y si la vida me diera la oportunidad de volver a nacer no dudaría en volver a escogerte a ti como mi madre, gracias por que no solo eres mi madre carnal sino también espiritual. Y mis triunfos son los tuyos. Gracias por creer en mí.

Papi yo se que te hubiera encantado ver este momento, no estás aquí presente pero vives en mi corazón y estaré siempre agradecida con la vida por todo el amor que me diste, por la educación y los valores que me inculcaste

Luis porque a pesar de que la vida te depara caminos distintos, tu sabes que este triunfo es tuyo, gracias por todos aquellos momentos hermosos que me brindaste, por todo el apoyo incondicional para que terminara una carrera, y ahora que he llegado a la meta es como si tú mismo lo hubieras logrado por que mis desveladas, mis alegrías, tristezas tu las viviste paso a paso conmigo, estuviste ahí para darme la mano y levantarme, gracias por la preciosa niña que me diste, te estaré agradecida toda la vida.

Citlali hermosa tal vez ahora este muy pequeña y no puedas leer estas palabras, pero sé que algún día lo podrás hacer y quiero decirte que tú has sido mi motor para yo poder ser una mejor persona, tu le inyectas a mi vida fuerza para salir adelante y que todo lo que yo hago en esta vida es por ti, para poder darte una buena educación, te amo mi amor y mientras yo viva siempre estaré ahí para guiarte en tu largo camino.

Faby te amo mi hermanita hermosa, no sabes que contenta estoy de tenerte cerca de mí, te agradezco todas esas palabras que me diste cuando yo sentía que desmayaba, **chuchito** mi hermanito el mas pequeñito pero que a tu corta edad tuviste que asumir el papel del hombre de la casa, gracias por esas sonrisas hermosas que me regalas, **Anita** negrita hermosa, esta tesis es tuya porque sin tu apoyo y cariño no lo habría logrado jamás, gracias por todo el amor y el apoyo que le has brindado a mi bebe mientras yo me ausento, jamás tendré como pagarte todo este apoyo.

- *A mis amigos*

Emi te quiero mucho eres la mejor persona que Dios me pudo poner en mi camino, eres como mi segunda mama y mi ángel, gracias por todo ese apoyo incondicional que siempre me diste, por tus consejos, por tus abrazos y tus sonrisas.

Ing. Gabriel Ugarte tengo mucho que agradecerle, porque usted fue el primer instrumento que Dios utilizó para ayudarme a encontrar el camino hacia un carrera, lo aprecio mucho es una excelente persona, jamás había conocido a alguien tan bueno y noble como usted, alguna vez me dijo “**estas hecha en C.U, pero también estas hecha en Soluciones**” y eso nunca lo voy a olvidar, por que usted siempre será un ángel en mi vida.

Isa y Celia gracias por todo el apoyo que me brindaron porque ustedes son parte de esta tesis, les agradezco todo lo bueno que han hecho por mí, las quiero nunca cambien.

Rosita mi querida amiga la más alegre, no sabes que tan agradecida estoy con Dios por ponerte en mi camino, siempre me mando ángeles protectores y tú eres uno de ellos. Sin tu ayuda nunca hubiera logrado terminar este proyecto, espero tenerte siempre en mi vida porque amistades como las tuyas no son fáciles de encontrar.

Hugo y Carlos mis compañeros interminables de toda la carrera, gracias por todos los bellos momentos que pasamos juntos, por todas esas locuras, preocupaciones o tristezas, siempre los llevo en mi corazón y serán mis amigos toda la vida.

Luz Elena, Erika, Miriam, Alicia, Norma y Nancy las quiero muchas gracias por ser mi fuerza y apoyo durante alguna parte de mi carrera, por sus consejos, alegrías y por estar siempre en los momentos que yo más las necesitaba.

INDICE

	<i>Página</i>
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ESQUEMAS	III
LISTA DE GRAFICÁS	IV
LISTA DE ESPECTROS	V
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
JUSTIFICACIÓN	3
<i>CAPITULO I (Generalidades)</i>	
1.1.- Antecedentes	5
1.1.1.- Flavonoides	5
1.1.2.- Estructura química	6
1.1.3.- Biogénesis	6
1.2.- Tirosinasa	9
1.2.1.- Mecanismo de acción	9
1.2.2.- Localización	12
1.2.3.- Clasificación	12
1.3.- Melanogénesis	13
1.4.- Reacciones de pardeamiento	15
1.4.1.-Sustratos fenólicos	16
1.4.2.- Sustratos de la tirosinasa	17
1.4.3.- Prevención del pardeamiento enzimático	17
1.4.3.1.- Inactivación de la enzima por calor	18
1.4.3.2.- Inhibiendo el oxígeno del medio	18
1.4.3.3.- Adición de agentes químicos	18
1.4.3.4.- Adición de inhibidores	19

1.5.- Cinética enzimática	20
1.5.1.- Actividad enzimática	20
1.5.2.- Modelo de Michaelis-Menten	22
1.6.- Tipo de inhibición	23
1.6.1.- Inhibición competitiva	23
1.6.2.- Inhibición no competitiva	25
1.6.3.- Inhibición acompetitiva	26
1.6.4.- IC ₅₀	28
1.7.- Quercetina	28

CAPITULO II (Desarrollo experimental)

2.1.- Esquema de trabajo general	31
2.2.- Material, reactivos y equipos	32
2.2.1.- Parte orgánica	32
2.2.2.- Métodos de separación	32
2.2.3.- Identificación de los compuestos	32
2.3.- Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona)	32
2.4.- Aislamiento de pendulina	33
2.4.1.- Materia vegetal	33
2.4.2.- Extracción y purificación	33
2.5.- Purificación de sakuranina (5-glucosil-7-metil-naringenina)	34
2.6.- Purificación de 2', 5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona	35
2.7.- Obtención de los derivados semisintéticos	36
2.7.1.- Acetilación de pendulina	36
2.7.2.- Hidrólisis de pendulina	37
2.8.- Equipo	38
2.9.- Parte biológica	39
2.9.1.- Determinación de Actividad Enzimática	39
2.9.2.- Progreso de la reacción	39
2.9.3.- Tipo de inhibición	41

2.9.4.- Determinación de IC ₅₀	42
2.9.5.- Preparación de reactivos	43
2.9.5.1.-Tirosinasa comercial (1.14.18.1)	43
2.9.5.2.- Quercetina 5mM (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona)	43
2.9.5.3.- L-DOPA 10mM (3,4-Dihidroxifenilalanina)	43
2.9.5.4.- DMSO (Dimetil sulfóxido)	44
2.9.5.5.- Amortiguador de fosfatos pH 6.5 (0.1M)	44
2.9.5.6.- Inhibidores (0.5mM)	44
2.10.- Equipo	45

CAPITULO III (Discusión de resultados)

3.1.- Actividad enzimática de la tirosinasa	47
3.1.1.- Progreso de la reacción	47
3.2.- Tipo de inhibición	50
3.2.1.- Quercetina	50
3.2.1.1.- IC ₅₀	50
3.2.2.- Pendulina	52
3.2.2.1.- IC ₅₀	52
3.2.3.- Sakuranina	54
3.2.3.1.- IC ₅₀	54
3.2.4.- 2', 5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona	56
3.2.4.1.- IC ₅₀	56
3.2.5.- Tetracetato y pentacetato de pendulina	58
3.2.6.- Penduletina	58
3.2.6.1 IC ₅₀	59

CAPITULO IV (Conclusiones)

Conclusiones	61
--------------	----

CAPITULO V (Bibliografía)

Bibliografía	63
--------------	----

LISTA DE TABLAS

		<i>Página</i>
Tabla 1	Agentes Químicos con Acción Inhibitoria en el pardeamiento enzimático (Mundo alimentario. Mayo/Junio 2009).	19
Tabla 2	Cantidad de los reactivos utilizados en el ensayo continuo.	40
Tabla 3	Cantidad de los reactivos utilizados en el ensayo interrumpido.	40
Tabla 4	Concentraciones utilizadas de los flavonoides naturales y semisintéticos.	41
Tabla 5	Cantidad de los reactivos utilizados para la determinación del tipo de inhibición.	42
Tabla 6	Concentraciones utilizadas de los flavonoides naturales y semisintéticos para el IC ₅₀	42
Tabla 7	Cantidad de los reactivos utilizados para la determinación del IC ₅₀	43

LISTA DE FIGURAS

		<i>Página</i>
Figura 1	Estructura básica de los flavonoides	6
Figura 2	Estructuras químicas de flavonoides	8
Figura 3	Reacciones de pardeamiento	15
Figura.4	Estructura de algunos sustratos	16
Figura.5	Estructuras de algunos sustratos	16
Figura 6(a) y 6(b)	Cinéticas de las reacciones catalizadas por enzimas.	23
Figura 7	Cinética competitiva	23
Figura 8	Representación de inhibición competitiva	24
Figura 9	Cinética no competitiva	25
Figura 10	Representación de inhibición no competitiva	26
Figura 11	Cinética acompetitiva	26
Figura 12	Representación de una inhibición acompetitiva	27
Figura 13	Representación del IC ₅₀ (Tae Joung Ha., et al., 2003)	28
Figura 14	Inhibición de la Quercetina en la actividad difenolasa de la tirosinasa(Chen, Qing-Xi and Kubo, I., 2002)	29
Figura 15	Quelatación de los Cu ²⁺ presentes en el sitio activo de la tirosinas(Xie, Li-Ping., et al., 2002)	29

LISTA DE ESQUEMAS

		<i>Página</i>
Esquema 1	Vía biosintética de los flavonoides	7
Esquema 2	Mecanismo de acción de la tirosinasa (Peñalver, M. J., et al., 2005)	11
Esquema 3	Vía de la melanogénesis (Seo, Sung –Yum., et. al. 2003)	14

LISTA DE GRÁFICAS

		<i>Página</i>
Gráfica 1	Progreso de la reacción enzimática ⁽¹⁾	47
Gráfica 2	Progreso de la reacción enzimática ⁽²⁾	48
Gráfica 3	Modelo de Michaelis –Menten	49
Gráfica 4	Modelo Lineweaver-Burk	49
Gráfica 5	Inhibición competitiva de quercetina	51
Gráfica 6	IC ₅₀ para quercetina	51
Gráfica 7	Inhibición competitiva de pendulina	53
Gráfica 8	IC ₅₀ para Pendulina	53
Grafica 9	Inhibición competitiva de sakuranina	55
Gráfica 10	La actividad no disminuyó, se mantiene cercana a un 80%	55
Gráfica 11	Inhibición competitiva de 2',5,7-trihidroxi-3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona	57
Gráfica 12	IC ₅₀ para 2',5,7-trihidroxi-3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona	57
Gráfica 13	Inhibición competitiva de penduletina	59

LISTA DE ESPECTROS

		<i>Página</i>
Espectro 1	RMN ¹ H para Quercetina (3,3', 4, 5,7-pentahidroxiflavona)	67
Espectro 2	RMN ¹ H para Pendulina	68
Espectro 3	RMN ¹ H para Sakuranina(5-glucosil-7-metil-naringenina)	69
Espectro 4	RMN ¹³ C para Sakuranina(5-glucosil-7-metil-naringenina)	70
Espectro 5	RMN ¹ H para 2', 5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona	71
Espectro 6	RMN ¹³ C para 2', 5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona	72
Espectro 7	RMN ¹ H para Tetracetato de pendulina	73
Espectro 8	RMN ¹³ C para Tetracetato de pendulina	74
Espectro 9	RMN ¹ H para Pentacetato de pendulina	75
Espectro 10	RMN ¹³ C para Pentacetato de pendulina	76
Espectro 11	RMN ¹ H para Penduletina	77
Espectro 12	RMN ¹³ C para Penduletina	78

INTRODUCCION

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se nombra a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Los flavonoides son compuestos fenólicos, cuyo esqueleto se compone de dos anillos aromáticos unidos por un núcleo de benzopirano, éstos pueden clasificarse en varios grupos: **Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos y rotenoides.**

Los flavonoides tienen varias propiedades, algunas de ellas son como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios y otra muy importante es como inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa; también conocida en la industria alimentaria como **polifenol oxidasa (PPO) o cresolasa**, la cual es responsable del oscurecimiento o el pardeamiento enzimático en algunos alimentos (Fennema, Owen R.,1993) tales como: frutas (aguacate, manzana, plátano, peras, melocotón), vegetales, champiñones y algunos crustáceos, incluso en la industria del vino, al producir alteraciones en el color que reducen el valor comercial de los productos, y los hacen inaceptables para el consumidor. Este oscurecimiento se debe a que la tirosinasa, la cual es una enzima presente en los alimentos en presencia de oxígeno molecular y teniendo como sustrato algún fenol como la L-dopa o la tirosina lleva a cabo una oxidación enzimática, produciendo quinonas, las cuales reaccionan espontáneamente formando polímeros coloridos conocidos como melaninas. Al caracterizar flavonoides de ciertas plantas, se pretende encontrar nuevos inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa de origen natural, que puedan sustituir a los sintéticos los cuales presentan efectos secundarios indeseables.

OBJETIVO GENERAL

Aislar compuestos de tipo flavonoide de plantas, para ser usados como nuevos inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Aislar y purificar compuestos de tipo flavonoide de algunas plantas de la familia *Compositae*, mediante cromatografía en columna y en placa fina.
- ❖ Identificar los flavonoides aislados mediante técnicas espectroscópicas de RMN de hidrógeno y C-13.
- ❖ Obtener derivados semisintéticos de los compuestos flavonoides aislados, mediante reacciones de hidrólisis y acetilación.
- ❖ Determinar la actividad enzimática de la tirosinasa obteniendo sus parámetros cinéticos K_m y V_{max} en ausencia y presencia de los compuestos flavonoides de origen natural y semisintéticos.
- ❖ Determinar el tipo de inhibición que presentan los flavonoides naturales pendulina, sakuranina (5-glucosil-7-metil-naringenina), 2',5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona, así como a los derivados semisintéticos pentacetato de pendulina, tetracetato de pendulina y penduletina sobre la actividad enzimática de la tirosinasa.
- ❖ Obtener experimentalmente el IC_{50} de la quercetina y de los compuestos que inhibieron de manera significativa, la actividad enzimática de la tirosinasa.

JUSTIFICACIÓN

Los Flavonoides naturales y semisintéticos al presentar una estructura química y características similares al de la Quercetina, pueden actuar como inhibidores de la actividad enzimática de la tirosinasa, logrando evitar la formación de melaninas, las cuales son indeseables en los alimentos como frutas, vegetales y mariscos.

CAPÍTULO I

Generalidades

1.1.- ANTECEDENTES

1.1.1.- Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por Albert Szent-Gyorgyi, quien les denominó en un principio como "vitamina P". El Dr. Szent-Gyorgyi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las cuales las que confieren colores como el amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, a flores, hojas y frutos.

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro, y soya, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en formas de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, *Gingko biloba*, cardo mariano o *Crataegus*. Otras de sus funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre.

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. En la uva estas moléculas se localizan en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las semillas. En la cerveza también existe una gran cantidad de éstos, entre los que destacan los polihidroflavanos (catequina y epicatequina), las antocianinas (leucociaridina) y los flavonoles (miricetina) (Martínez M. Alejandro., 2005).

1.1.2.- Estructura química

Los flavonoides tienen una estructura química muy definida (Ver figura 1). Puede observarse de manera general que son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (ó aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, se puede denominar simplemente como compuestos $C_6C_3C_6$.

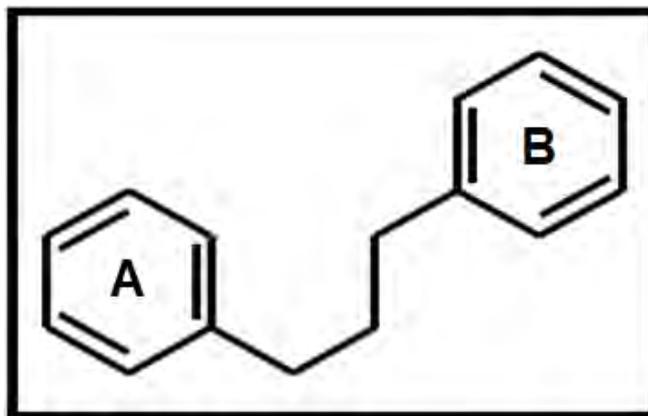
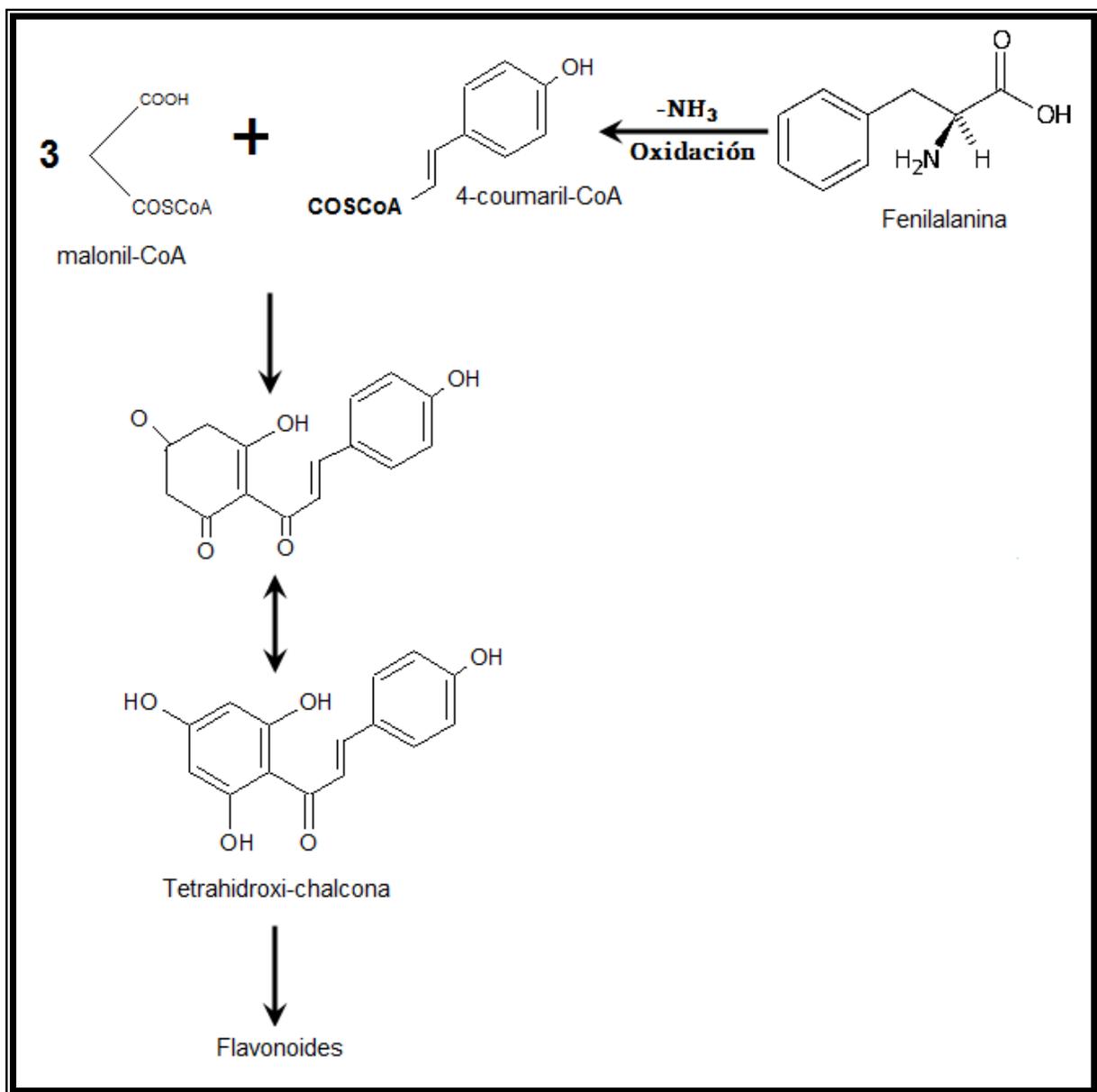


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides

1.1.3.- Biogénesis

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto: el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena de tres carbonos provienen de la fenilalanina, la cual da lugar a la formación de la 4-coumaril-CoA. Tres moléculas de malonilcoenzima A más una molécula de 4-coumaril-CoA se unen para formar la estructura base (tetrahidroxi-chalcona), la cual se cicla gracias a una enzima denominada isomerasa y puede sufrir posteriormente modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos (Harbone, J.B., 1993) ver esquema 1.



Esquema 1 Vía biosintética de los flavonoides.

Por consiguiente los flavonoides se clasifican en varios grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos y rotenoides, sus estructuras se muestran en la siguiente figura 2.

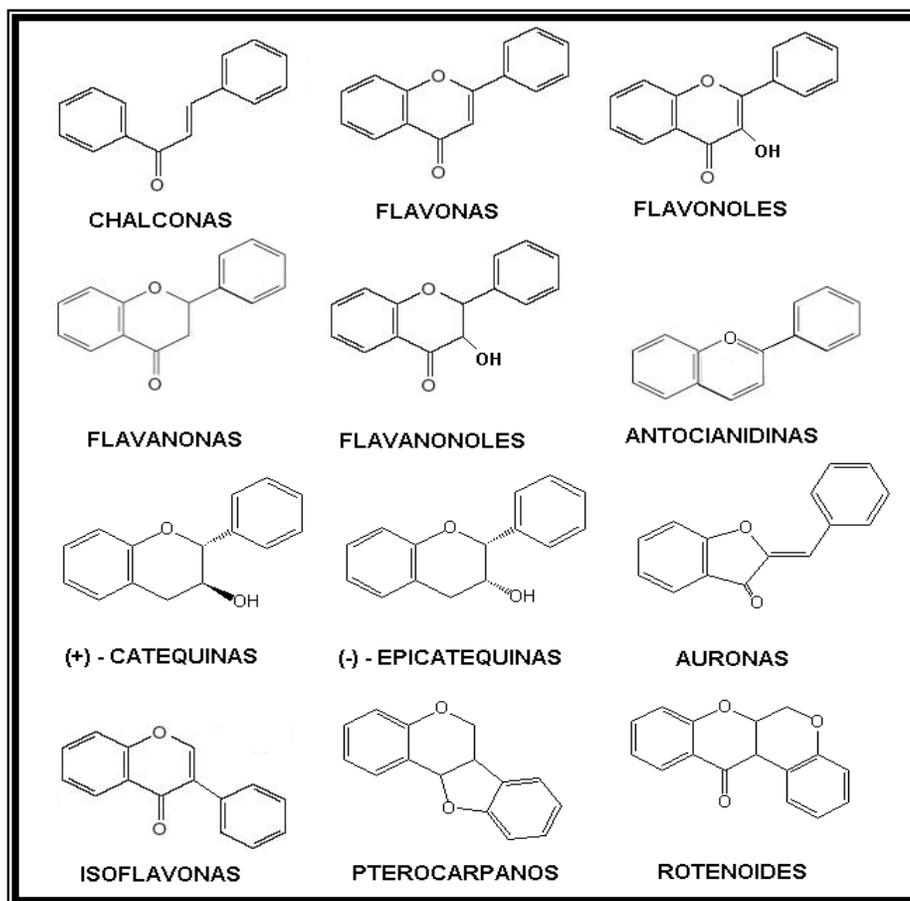


Figura 2 Estructuras químicas de flavonoides

La mayoría de los flavonoides poseen nombres triviales con la terminación ina u ol. Estos nombres triviales, han sido asignados por los investigadores que los han descubierto. Un ejemplo es la acetina se aisló por primera vez de una planta del género *Acacia* y se clasifica como una flavona. La quercetina es un flavonol identificado inicialmente de una planta del género *Quercus*. La naringenina es una flavanona aislada por primera vez de la naranja. El eriodictiol es una flavanona y se aisló inicialmente de una planta del género *Eriodictyon*. Sin embargo, esta clase de nombres no son útiles, cuando se requiere información sistemática de estas sustancias, por lo cual los químicos han convenido que acetina corresponde a la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona; la quercetina al 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona; la naringenina a la 4',5,7-trihidroxiflavanona y así sucesivamente (Martínez M. Alejandro., 2005).

1.2.- TIROSINASA

La tirosinasa también conocida como polifenol oxidasa (PPO) es una enzima que está ampliamente distribuida en microorganismos, animales y plantas (Kubo. I., Kinst-Hori, Ikubo., 1999). Esta enzima también se conoce con el nombre de fenolasa, catecolasa o cresolasa aplicado a la enzima vegetal. La tirosinasa contiene en su estructura un centro de cobre binuclear dentro de su sitio activo, los dos átomos de cobre son coordinados individualmente con tres residuos de histidina. El grupo prostético de la tirosinasa es el cobre. (Briones U. Marisol., 2008)

La tirosinasa aislada de hongos como el *Agaricus bisporus* ha sido utilizada en la mayoría de estudios, esta enzima como ya se había mencionado en el párrafo anterior presenta dos átomos de cobre en su sitio activo, los cuales pueden existir en tres estados que son los siguientes; **Deoxi tirosinasa** es la forma reducida de la enzima con $\text{Cu}^+ - \text{Cu}^+$, **Met tirosinasa** es la forma oxidada y contiene $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{2+}$. Finalmente, el último estado **Oxi tirosinasa** es la forma oxidada con peróxido $\text{Cu}^{2+} - \text{O}_2 - \text{Cu}^{2+}$.

Los tres estados participan durante la actividad monofenolasa y difenolasa las cuales son reacciones que participan en la melanogénesis, que son catalizadas por esta enzima (Briones U. Marisol., 2008).

1.2.1.- Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la tirosinasa se muestra en el esquema 2, donde la acción catalítica de la tirosinasa consiste en dos actividades:

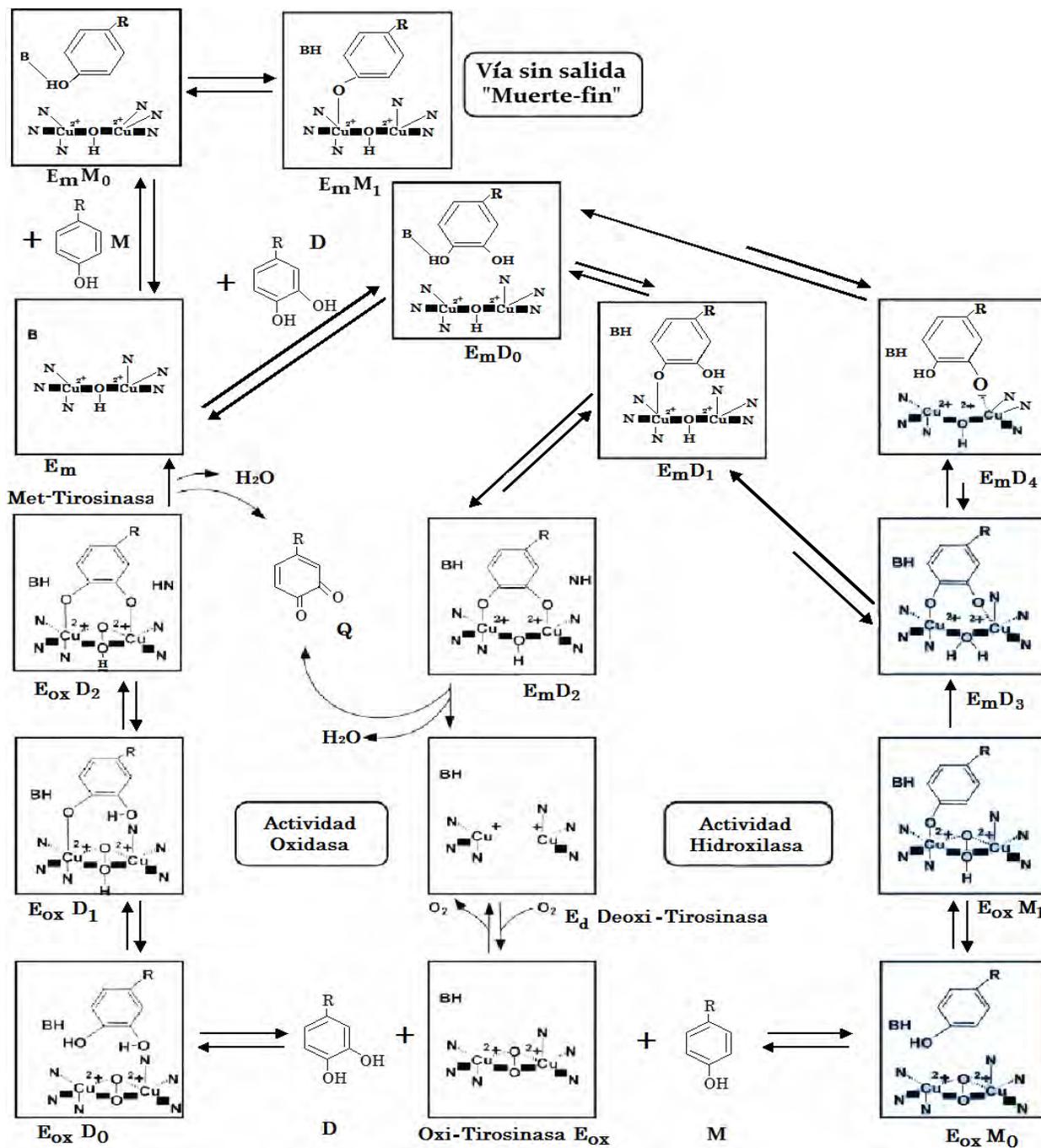
a) actividad catalítica monofenolasa

b) actividad catalítica difenolasa

La actividad catalítica monofenolasa de la enzima comienza cuando la forma “oxi” (E_{oxi}) reacciona con un monofenol (M), donde el OH de la posición C-4 reacciona con el nitrógeno de uno de los residuos de histidina formando un puente de hidrógeno, de esta manera se forma el complejo $E_{\text{oxi}}M_0$.

Posteriormente un ataque nucleofílico del oxígeno del grupo fenólico sobre uno de los cobres del centro activo de la enzima produce el complejo $E_{\text{oxi}}M_1$, mientras que el protón del grupo fenólico se une al grupo peróxido. Una vez formado el complejo $E_{\text{oxi}}M_1$, ocurre un ataque electrofílico de uno de los oxígenos del grupo peróxido a la posición orto del anillo aromático formando el complejo E_mD_3 , donde se forma una molécula de agua en el centro activo de la enzima. Este complejo (E_mD_3) puede transformarse en los intermediarios E_mD_1 o E_mD_4 , donde la enzima se encuentra en forma de met-tirosinasa (E_m), los cuales producen el orto-difenol (D) mas met-tirosinasa. La actividad catalítica difenolasa, comienza cuando la forma “oxi” de la enzima forma el complejo $E_{\text{ox}}D_0$, con una molécula de difenol (D), a continuación un ataque de un OH en posición para a uno de los átomos de cobre del sitio activo de la enzima da lugar al intermediario $E_{\text{ox}}D_1$, éste se reacomoda al complejo $E_{\text{ox}}D_2$, mediante un ataque de un segundo grupo OH (en posición meta) a uno de los átomos de cobre del sitio activo de la enzima. Posteriormente éste se descompone en la orto quinona y la enzima en forma de met-tirosinasa. (Penalver, M. J., et al., 2005).

“Durante el transcurso de la reacción al presentarse el estado E_m éste puede formar un complejo sin salida E_mM_1 (Dead-end), cuando reacciona con un monofenol (M), este complejo sin salida provoca un periodo largo en la actividad monofenolasa” (Xinastle C. Carlos., 2009).



Esquema 2 Mecanismo de acción de la tirosinasa (Peñalver, M. J., et al., 2005)

1.2.2.- Localización

La tirosinasa fúngica se localiza en el citoplasma o se encuentra unida a membranas subcelulares. En *Agaricus bisporus*, se encuentra en compartimentos celulares distintos de los sustratos, en animales superiores está confinada a la piel, el cabello, las córneas y puede presentarse en tejidos internos como el cerebro. (Briones U. Marisol., 2008).

En el caso de la liberación de la tirosinasa, enzima presente en la mayoría de los alimentos, cuando las células sufren algún daño los fenoles son liberados al citoplasma, donde la tirosinasa se activa comenzando la oxidación. El mantenimiento o destrucción de la integridad de la localización de las enzimas es importante en los alimentos por varias razones, una de ellas es mantener la integridad bioquímica del alimento para poder obtener un mejor producto con lo que respecta a su calidad sensorial, un ejemplo de esto es en la maduración de los productos de origen vegetal, ya que para asegurar una maduración adecuada es preciso que se mantenga la integridad del tejido vegetal, pues la mayor parte de la fruta se recolecta cuando aun no está completamente madura y si ésta sufre algún daño mecánico producido durante la recolección o almacenamiento, se puede desencadenar una serie de reacciones de oscurecimiento enzimático en el alimento que lo haga sensorialmente indeseable (Lee, Byong H., 1996).

1.2.3.- Clasificación

Las enzimas se clasifican en seis grandes grupos atendiendo al tipo de reacción que catalizan. El primer dígito denota la clase principal (oxidoreductasas), el segundo y tercero las subclases, el cuarto es el número individual de la enzima dentro de la clase. (Lee, Byong H., 1996). La clasificación para la tirosinasa es la siguiente:

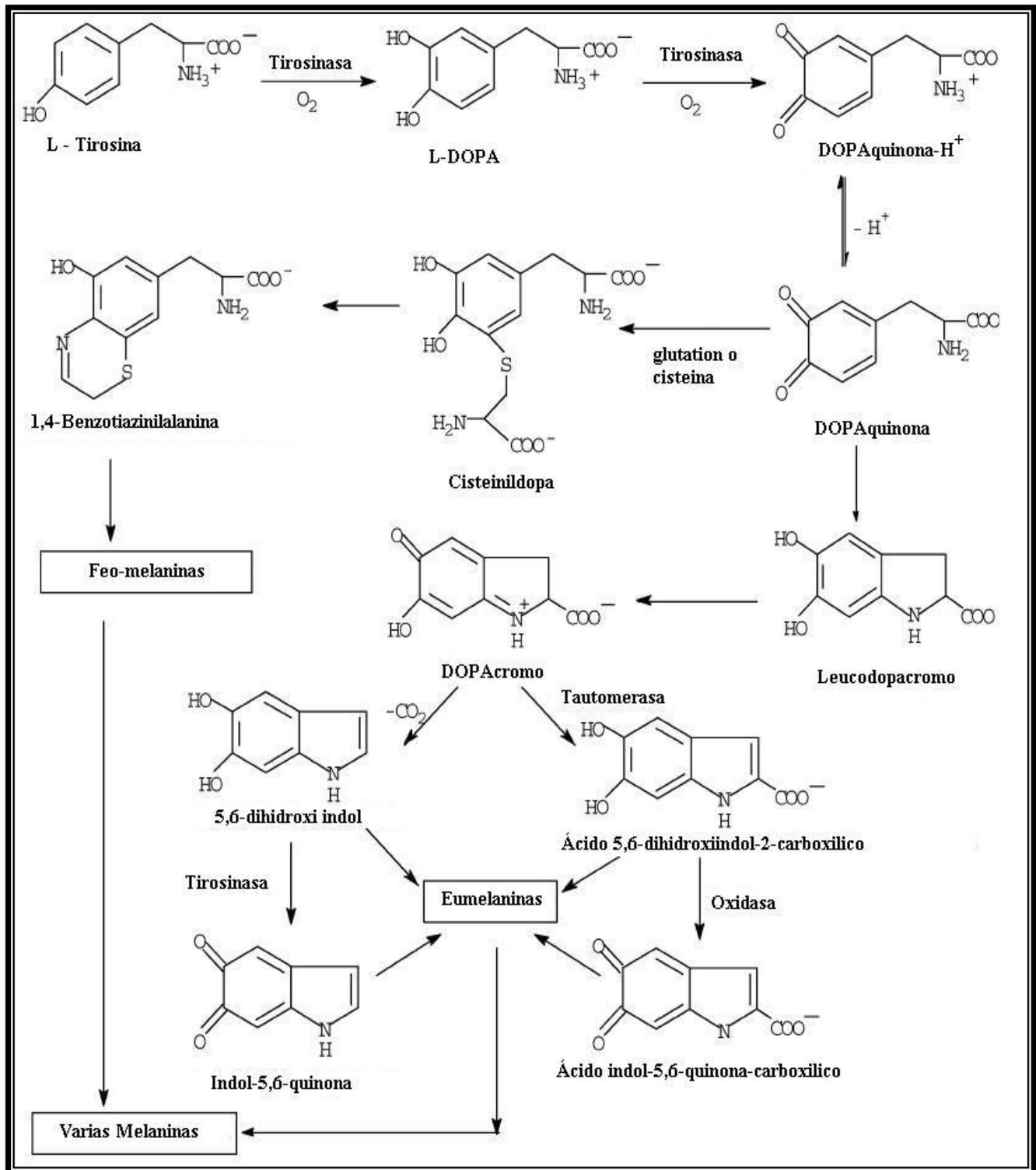
- EC 1.14.18.1 tirosinasa con actividad monofenolasa
- EC 1.10.3.1 tirosinasa con actividad o-difenolasa

1.3.- MELANOGÉNESIS

Es un proceso bioquímico importante por el cual se forman melaninas, las cuales son pigmentos marrones. La melanogénesis es un proceso bioquímico importante implicado en la producción de los pigmentos cutáneos, la misión de estos pigmentos es proteger a los animales del daño ocasionado por las radiaciones. En animales inferiores como los insectos se crea un exoesqueleto encargado de proteger el cuerpo blando.

Las anomalías de la melanogénesis se asocian en los humanos, a enfermedades como el albinismo, el vitiligo o el melanoma maligno. (Bartonik J.,1993).

En los alimentos tales como frutas y vegetales, la formación de melaninas comienza con la acción sucesiva de dos reacciones en presencia de oxígeno molecular, la primera que se lleva a cabo es la o-hidroxilación de sustratos monofenólicos a o-difenoles, seguida de una oxidación de estos compuestos producidos a o-quinona. "Cuando se utiliza como sustrato a la L-tirosina el primer producto formado a partir de la actividad monofenolasa es la L-DOPA, el segundo producto debido a la actividad difenolasa es la DOPA quinona, ésta al ser inestable, inmediatamente es transformada por reacciones no enzimáticas a un intermediario relativamente mas estable, el DOPAcromo, éste evoluciona hasta melaninas las cuales se pueden polimerizar entre si o reaccionar con aminoácidos y péptidos para resultar en pigmentos cafés, rojos o negros". (Xinastle Castillo C., 2009). Las cuales son indeseables en los alimentos ya que el aspecto sensorial que le dan no es agradable a la vista del consumidor. Ver Esquema 3.



Esquema 3 Vía de la melanogénesis (Seo, Sung –Yum., et. al. 2003)

1.4.- REACCIONES DE PARDEAMIENTO

El pardeamiento en los alimentos es debido a reacciones oxidativas (pardeamiento por la fenolasa) o no oxidativas (Maillard, la caramelización, la oxidación del ácido ascórbico). Las oxidativas, también conocidas como reacciones de oscurecimiento o pardeamientos enzimáticos son reacciones entre el oxígeno molecular y un sustrato fenólico y están catalizadas por enzimas llamadas polifenol-oxidasas como la tirosinasa. Las no oxidativas o no enzimáticas incluyen aquellas reacciones de Maillard, de caramelización y oxidación del ácido ascórbico (Fennema, Owen R., 1993), de las cuales no se hablará ya que no forman parte importante para el desarrollo de este proyecto.

Las reacciones de pardeamiento enzimático se observan en los vegetales ricos en compuestos fenólicos y son las que suceden en manzanas, plátanos, peras e incluso en lechuga una vez que éstos son cortados, y no están relacionados con los carbohidratos ya que estos provocan reacciones de caramelización. El pardeamiento enzimático ocurre tanto en alimentos de origen animal, vegetal y principalmente en frutas y legumbres. En el tejido intacto, los sustratos fenólicos se encuentran separados de la fenolasa, por lo que no se producen pardeamientos, la exposición de la superficie de corte al aire da lugar a un rápido pardeamiento, debido a la oxidación enzimática de los fenoles a ortoquinonas, que a su vez se polimerizan rápidamente para formar melaninas y pigmentos de color pardo (ver figura 1). Las operaciones de cortar, pelar o exprimir los tejidos bastan para causar el pardeamiento enzimático (Fennema, Owen R., 1993).

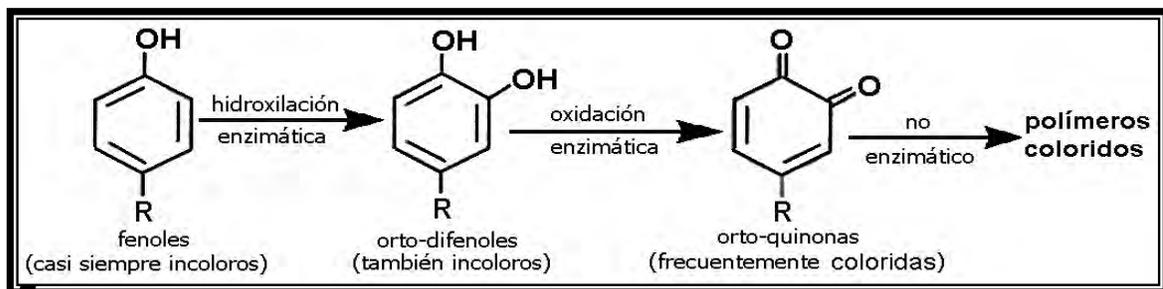


Figura 3 Reacciones de pardeamiento

1.4.1.-Sustratos fenólicos

Existen numerosos sustratos naturales del pardeamiento enzimático: mono, di o polifenoles. Su reactividad es más o menos elevada según su estructura y también según el origen de las enzimas que catalizan su oxidación. Además, una gran parte de estos sustratos se clasifican entre los principales constituyentes fenólicos de los vegetales; El pirocatecol y sus derivados, la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) formada de la tirosina (caso de la patata) y susceptible a oxidarse a dopaquinona.

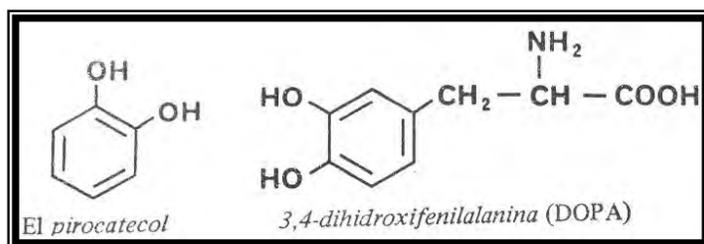


Figura 4 Estructuras de algunos sustratos

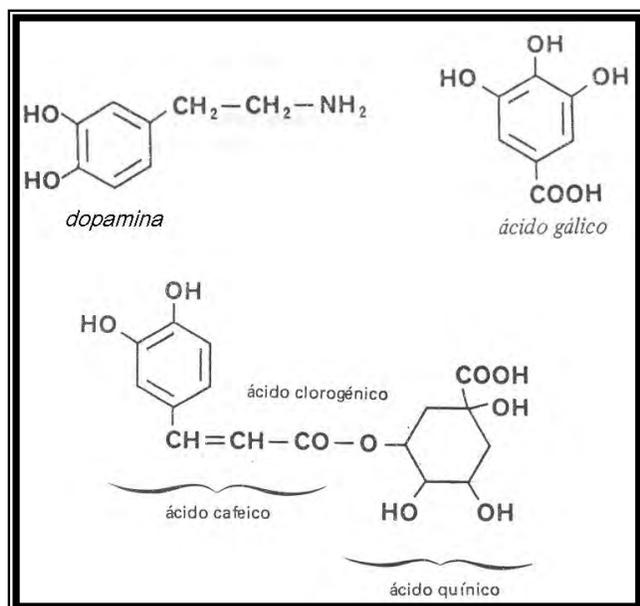


Figura 5 Estructuras de algunos sustratos

La 3,4-dihidroxifeniletilamina o dopamina, que es el sustrato principal del pardeamiento en los plátanos, los ácidos con anillo aromático, tales como el ácido gálico forman taninos hidrolizables, al igual que el ácido clorogénico y otros derivados del ácido cinámico y cumárico. El ácido clorogénico está presente en las manzanas, peras, patatas, etc (Ceftel, Jean – Claude., Chafel, Henri., 1992)

1.4.2.- Sustratos de la tirosinasa

La tirosinasa además del oxígeno molecular usa como sustratos, una gama de sustancias fenólicas como lo son; los monofenoles (p-cresol y tirosina), difenoles (el catecol, L-DOPA, D-DOPA, catequinas y ácido clorogénico) y trihidroxifenoles, sin embargo, presenta una mayor afinidad por los dihidroxifenoles (Seo, Sun-Yum., et al., 2003).

1.4.3.- Prevención del pardeamiento enzimático

La aparición de pigmentos de colores que van desde una gama de cafés hasta marrones y negros en los alimentos es indeseable, debido a que sensorialmente en los alimentos es desagradable, provoca su deterioro y reduce su valor comercial. Existen muchas formas para conservar los alimentos, es decir prevenir su oscurecimiento el cual es provocado cuando la tirosinasa está en contacto con los fenoles presentes en los alimentos, ya que la tirosinasa cataliza las dos primeras fases de las reacciones de melanogénesis, las cuales son responsables del color que aparece en estos.

El pardeamiento enzimático se puede controlar a través del uso de métodos físicos y químicos. Los físicos incluyen la reducción de temperatura y/o oxígeno, uso de empaque en atmósferas modificadas o recubrimientos comestibles, tratamiento con irradiación gama o altas presiones. Los métodos químicos utilizan compuestos que inhiban la enzima, eliminen sus sustratos (oxígeno y fenoles) o funcionen como un sustrato preferido (Carneiro, Jacomassi A., et al., 2006).

Existen numerosos medios para impedir el pardeamiento enzimático, pero por razones de costo, toxicidad, reglamentación o efectos secundarios desfavorables sobre la calidad (Ceftel, Jean – Claude., Chafel, Henri., 1992), solo se utilizan algunos, de los cuales describiremos los más utilizados.

1.4.3.1.- Inactivación de la enzima por calor

En aquellos alimentos en los cuales se encuentran enzimas PPO, es muy eficaz inactivarlas por medio de calor ya que todas las enzimas trabajan a una temperatura óptima y cuando la temperatura que se aplica es mayor al óptimo se puede llegar a modificar la estructura terciaria de la proteína y como consecuencia pierde su actividad catalítica, se pueden utilizar algunos métodos como precalentado, pasteurizado, o escaldado aunque a veces no son muy convenientes para ciertos alimentos ya que modifican sus características organolépticas. La inactivación con calor, causa la destrucción de algunos atributos tales como la textura, el sabor y pérdidas nutricionales.

1.4.3.2.- Inhibiendo el oxígeno del medio

La prevención del pardeamiento es posible, por lo menos temporalmente, a través de la eliminación de oxígeno de los tejidos. La desoxigenación se obtiene envasando el alimento al vacío, o por borboteo de nitrógeno. También puede conseguirse consumiendo el oxígeno: por medio de un antioxidante como el ácido ascórbico o por la acción de la glucosa oxidasa y de la catalasa. La desoxigenación debe ser seguida de otro método de conservación como la congelación y la deshidratación. (Ceftel, Jean – Claude., Chafte, Henri., 1992)

1.4.3.3.- Adición de agentes químicos

Se utilizan varios tipos de compuestos químicos para el control del pardeamiento (Mundo alimentario. Mayo/Junio 2009). Algunos tipos actúan directamente como inhibidores de PPO, otros propician un medio inadecuado para el desarrollo de la reacción de oscurecimiento, y otros reaccionan con los productos de la reacción de PPO antes de que lleguen a formar los pigmentos oscuros. Algunos de ellos son los ácidos como el cítrico, tartárico, málico, láctico, etc. Actúan como acidulantes disminuyendo el pH o algunas veces como el caso del cítrico formando un quelato con los cobres de la PPO.

1.4.3.4.- Adición de inhibidores

Otra forma de prevenir el pardeamiento enzimático es el uso de inhibidores. La acción de un inhibidor implica la fijación de éste a alguna forma de la enzima, lo que da por resultado la pérdida total o parcial de la actividad de la enzima para transformar sustratos a productos.

Existen diferentes tipos de inhibidores: los competitivos, los no competitivos y los acompetitivos, además de que poseen distinto mecanismo de acción (Bohinski, C. Robert., 1991).

Estos inhibidores pueden ser naturales como la quercetina, kurarinona, kaempferol, los cuales son polifenoles extraídos de plantas; también existen proteínas como la metalotioneína que actúa como un fuerte agente quelante del cobre y la agaritina la cual es aislada de *A. bisporus*, presenta dos tipos de inhibición competitiva y no competitiva

La hidroxilamina, dimetil sulfuro, los ácidos dihidroxibenzoicos (DBA), la L-mimosina, el ácido kójico, la tropolona y los resorcinoles sustituidos en la posición 4 (oxiresveratrol) son inhibidores de origen sintético (Seo, Sung-Yum., et al., 2003).

1.5.- CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, nos proporciona información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima se puede determinar indirectamente midiendo, ya sea la desaparición de su sustrato o la aparición de su producto.

La velocidad de reacción enzimática es una función que depende fuertemente de factores como la temperatura, el pH y la concentración de enzima entre otros.

El ensayo de medición puede ser de dos tipos:

- **Interrumpido**, en el cual se toman muestras de la solución de reacción a intervalos de tiempo definidos para analizarlo.
- **Continuo**, en el que se va siguiendo a lo largo del tiempo los cambios en la concentración ya sea del sustrato o del producto. (Castellanos R. Luz., et al., 2003).

1.5.1.- Actividad enzimática

Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml).

También es posible determinar la actividad de una enzima siguiendo de manera continua el incremento o decremento de la absorbencia producido por la desaparición de sustrato o aparición del sustrato o del producto. Como resultado de estas mediciones se obtiene una serie de absorbencias con las cuales es posible construir una gráfica de tiempo vs absorbencia.

Cuando se relaciona la absorbancia que aumenta en función del tiempo con la concentración del producto se puede obtener el valor de la actividad de la enzima y la velocidad a la cual transcurre la reacción, esto se hace por medio de la Ley de Lambert Beer:

$$A = \varepsilon cl$$

Donde:

A = Absorbancia

ε = Coeficiente de extinción molar ($L \text{ mol}^{-1}, \text{cm}^{-1}$)

C = concentración (mol L^{-1})

l = longitud de la celda (cm)

Cuando se conoce el coeficiente de extinción molar se puede calcular la cantidad del producto que aparece en función del tiempo y con esto se puede cuantificar la actividad de la enzima

$$V = \frac{\Delta \text{Absorbancia}_{nm}}{\Delta t \text{ (min)}}$$

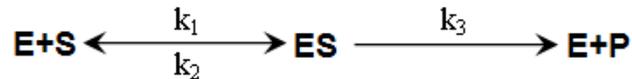
Se despeja la variable de concentración de la ecuación de Lambert Beer y se obtiene la siguiente ecuación, con la cual podemos obtener la cantidad de producto formado por unidad de tiempo.

$$V = \frac{\Delta \text{Absorbancia}_{nm} \times \text{Volumen del ensayo}(L)}{\varepsilon(L \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times l(\text{cm}) \times t(\text{min}) \text{ cantidad de enzima}(mL \text{ o } \mu\text{g})}$$

En el mecanismo enzimático más simple, la enzima y el sustrato se unen reversiblemente formando un complejo enzima-sustrato (ES) conocido como el complejo de Michaelis-Menten, el cual involucra dos parámetros: la K_m y V_{max} (Castellanos R. Luz., et al., 2003).

1.5.2.- Modelo de Michaelis-Menten

El modelo de la constante de Michaelis asume que una molécula de sustrato (S) forma un complejo intermedio (ES) con una molécula de enzima (E) para disociarse después en un producto (P) y una enzima libre (E):



La forma más usual de la ecuación de Michaelis-Menten es:

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

donde V_{\max} es la máxima actividad posible de la enzima cuando está totalmente saturada de sustrato y K_m es la concentración de sustrato para la que la velocidad sea la mitad de la máxima tal y como se muestra en la figura 6(a).

La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar tomando la recíproca en ambos lados de la ecuación.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

Una representación de $1/V$ (donde v es la velocidad inicial de formación) frente a $1/[S]$, propuesta por Lineweaver y Burk, da una línea recta en lugar de la hipérbola rectangular como lo muestra la figura 6(b) Tal representación de doble recíproca permite una determinación más exacta de la K_m y V_{\max} . (Lee, Byong H.,1996). En donde el intercepto de las abscisas será $-1/K_m$ y el intercepto de las ordenadas será $1/V_{\max}$. Una K_m alta significa baja afinidad ES, mientras que una K_m baja significa alta afinidad ES.

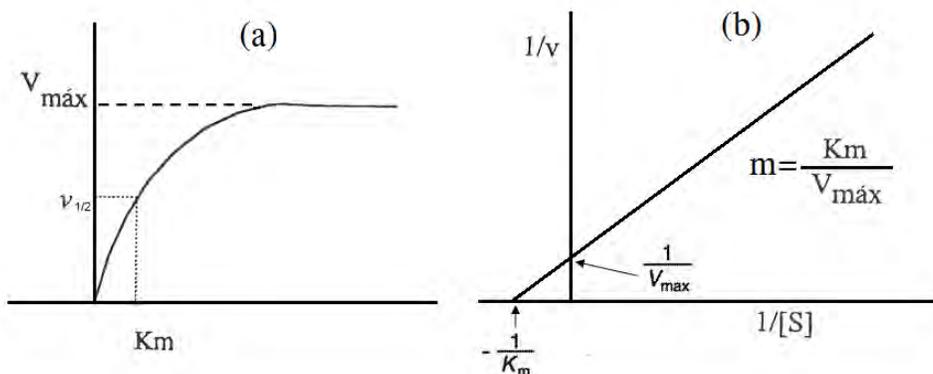


Figura 6(a) y 6(b). Cinéticas de las reacciones catalizadas por enzimas

1.6.- TIPO DE INHIBICION

1.6.1.- Inhibición competitiva

Un inhibidor competitivo es cierta sustancia que se fija de modo reversible a la forma libre de la enzima y produce un complejo binario. Así cuando están presentes enzima, sustrato e inhibidor, la enzima puede fijarse al sustrato para formar un complejo **ES** y dar como resultado un producto más la enzima libre, o bien puede unirse al inhibidor para formar el complejo **EI**, e inhibir la ruta, pero nunca puede fijarse a ambos para formar **EIS** tal como lo muestra la figura 7. (Bohinski, C. Robert., 1991), en donde K_1 es la constante de disociación del inhibidor para $\text{EI} \rightleftharpoons \text{E} + \text{I}$

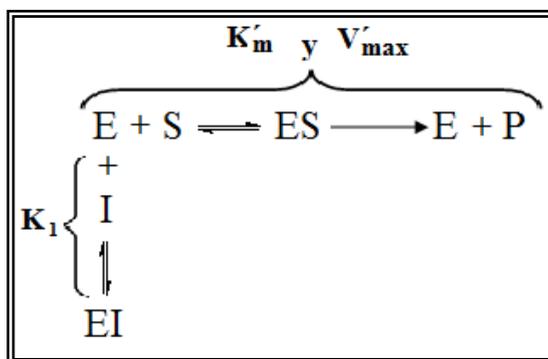


Figura 7. Cinética competitiva

Así los inhibidores competitivos son estructuralmente similares al sustrato y se unen al centro de fijación del sustrato, compitiendo con éste por la enzima. Una vez unido, la enzima no puede convertir al inhibidor en productos.

Dado que el sustrato y el inhibidor compiten por el mismo centro de la enzima, la K_m del sustrato muestra un incremento aparente en presencia del inhibidor. Esto queda plasmado en una gráfica de doble recíprocos como un desplazamiento en la intersección en el eje de las X (esto es, $-1/K_m$) y en la pendiente de la línea (K_m/V_{max}) como se muestra en la figura 8 (Devlin, M. Thomas., 2004). Como la formación del complejo EI reduce la concentración de la enzima disponible para interactuar con el sustrato, la velocidad máxima de reacción disminuye (Bohinski, C. Robert., 1991). Esto se puede contrarrestar aumentando la concentración del sustrato por lo tanto la reacción se ve favorecida a la formación del complejo ES, por lo tanto la velocidad máxima se puede alcanzar y como consecuencia la V_{max} no se modifica, mientras que la K_m aumenta.

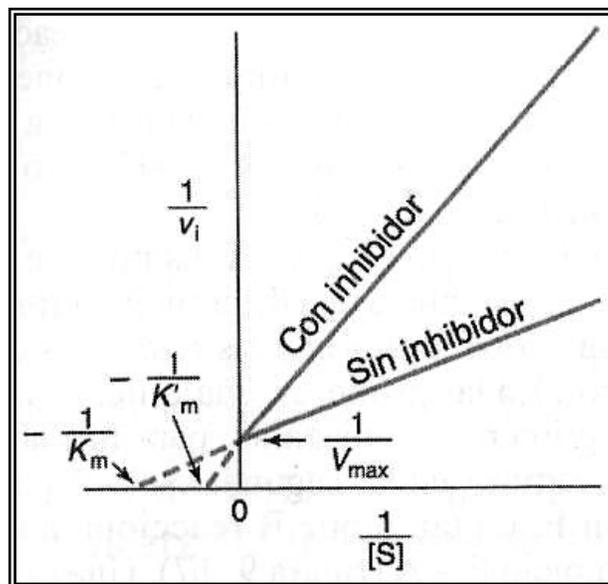


Figura 8. Representación de inhibición competitiva

1.6.2.- Inhibición no competitiva

Es cuando el efecto del inhibidor no se contrarresta al incrementar la concentración del sustrato. La acción de un inhibidor no competitivo implica la fijación del Inhibidor tanto a la enzima libre como al complejo ES, de modo que en el segundo de los casos se forma un complejo ternario EIS. El complejo EIS también puede formarse por fijación del S al complejo EI, es decir un inhibidor no competitivo no impide la unión del sustrato como lo muestra la Figura 9 (Bohinski, C. Robert., 1991).

K_s es la constante de disociación del sustrato para $ES \rightleftharpoons E+S$ o' $ESI \rightleftharpoons EI+S$
 K_1 es la constante de disociación del inhibidor para $EI \rightleftharpoons E+I$ o' $ESI \rightleftharpoons ES+I$

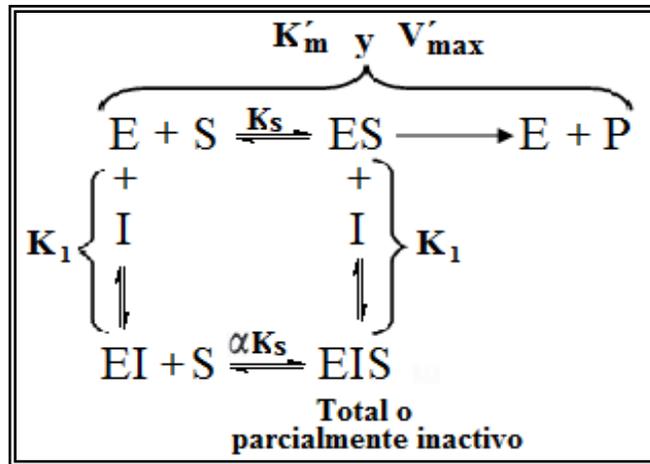


Figura 9. Cinética no competitiva

El inhibidor no competitivo actúa como si eliminase enzima activa de la solución, lo que da lugar a una disminución en V_{max} , pero K_m no cambia (Devlin, M. Thomas., 2004), esto se puede observar en la figura 10

En este tipo de inhibición la K_m y la V_{max} ambas se modifican, la presencia de inhibidor hace que disminuya la K_m aparente en la misma proporción que la V_{max} (como el I se une al complejo ES su presencia se manifiesta también a elevadas $[S]$, por lo que disminuye V_{max}). La K_m aparente disminuye (lo cual quiere decir que la $[S]$ precisa para alcanzar $1/2 v_{m\acute{a}x}$ será menor). No es que haya aumentado la afinidad de E por S: en realidad se mantiene igual, pero como la $v_{m\acute{a}x}$ ha disminuido, se precisará menor $[S]$ para alcanzar $1/2 v_{m\acute{a}x}$ y por eso la K_m disminuye -y la afinidad aumenta- aparentemente (Devlin, M. Thomas., 2004). La inhibición acompetitiva es poco frecuente en las reacciones de un solo sustrato, pero es muy común en las reacciones de dos sustratos. (Ver figura 12).

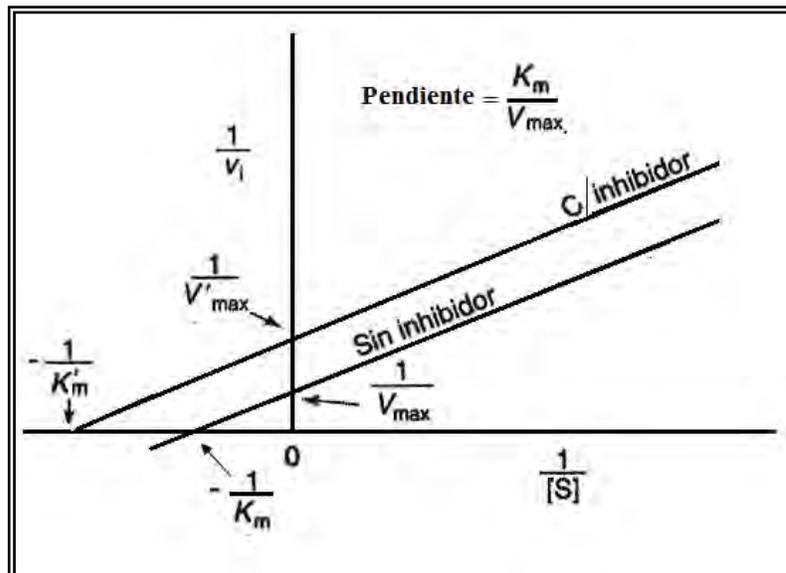


Figura 12. Representación de una inhibición acompetitiva

1.6.4.- IC_{50}

El IC_{50} es la cantidad de inhibidor que se necesita para lograr disminuir la actividad enzimática en un 50%. Para poder determinar este estudio se tiene que variar la concentración del inhibidor en forma creciente, y se mantiene fija la concentración de enzima y sustrato. Con los datos obtenidos se realiza una grafica de concentración del inhibidor (mM o μ M) vs actividad enzimática en porcentaje (%). La figura 13 muestra un ejemplo de la representación gráfica del IC_{50} de quercetina sobre la actividad de lipoxigenasa-1 de frijol de soya (Joung Ha. Tae., et al., 2003).

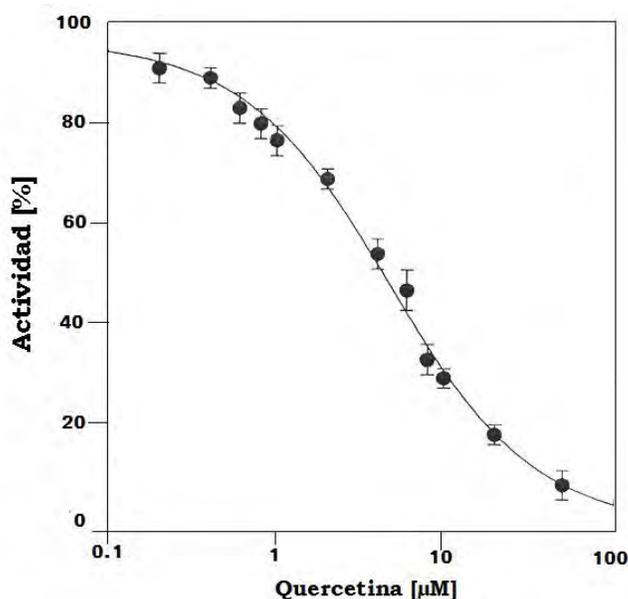


Figura 13. Representación del IC_{50} (Joung Ha. Tae., et al., 2003).

1.7.- QUERCETINA

La quercetina es un flavonol que presenta una inhibición del tipo competitiva sobre la actividad enzimática de la tirosinasa, actúa inhibiendo la actividad o-difenolasa, que es una reacción catalizada por la tirosinasa, esto se debe a la relación que existe entre la quercetina y la forma met-tirosinasa y oxi-tirosinasa que se presenta en el sitio activo de la enzima, en donde la quercetina desplaza al o-difenol(sustrato) del sitio activo, por la similitud que tiene su estructura con la o-difenol, evitando así la oxidación parcial o total del sustrato(Isao Kubo, 1997.)

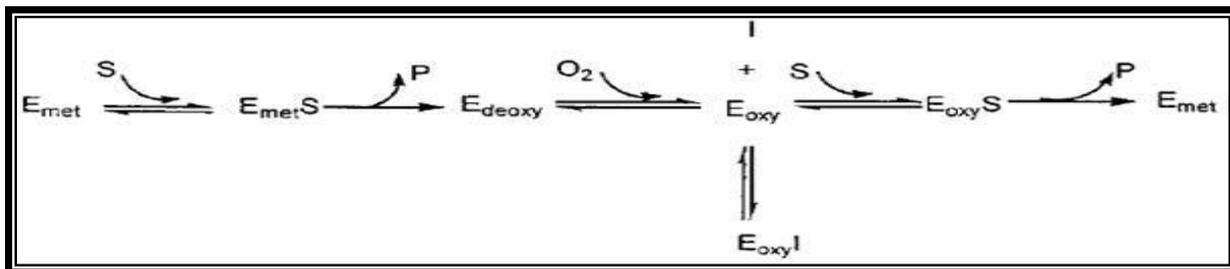


Figura 14. Inhibición de la Quercetina en la actividad difenolasa de la tirosinasa (Chen, Qing-Xi and Kubo, I., 2002)

Otra forma que se ha propuesto es que la quercetina actúa como agente quelante sobre los cobres que están presentes en el sitio catalítico de la enzima, puede formar el quelato de tres formas

- ❖ Con el grupo catecol del anillo B presente en la quercetina tal como se muestra en la figura 15.
- ❖ Con el hidroxilo situado en la posición 3, junto con el grupo carbonilo en posición 4 ambos presentes en el anillo C de la quercetina.
- ❖ O bien el grupo carbonilo en posición 4 junto con el grupo hidroxilo situado en la posición 5 del anillo A de la quercetina.

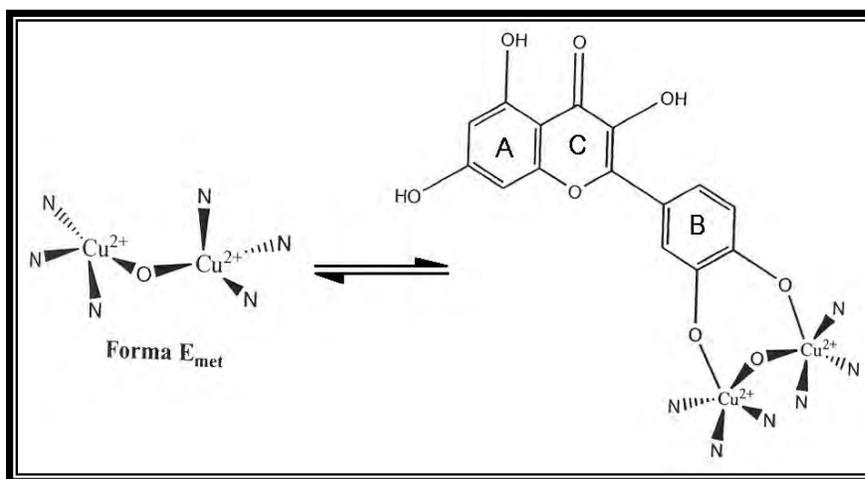
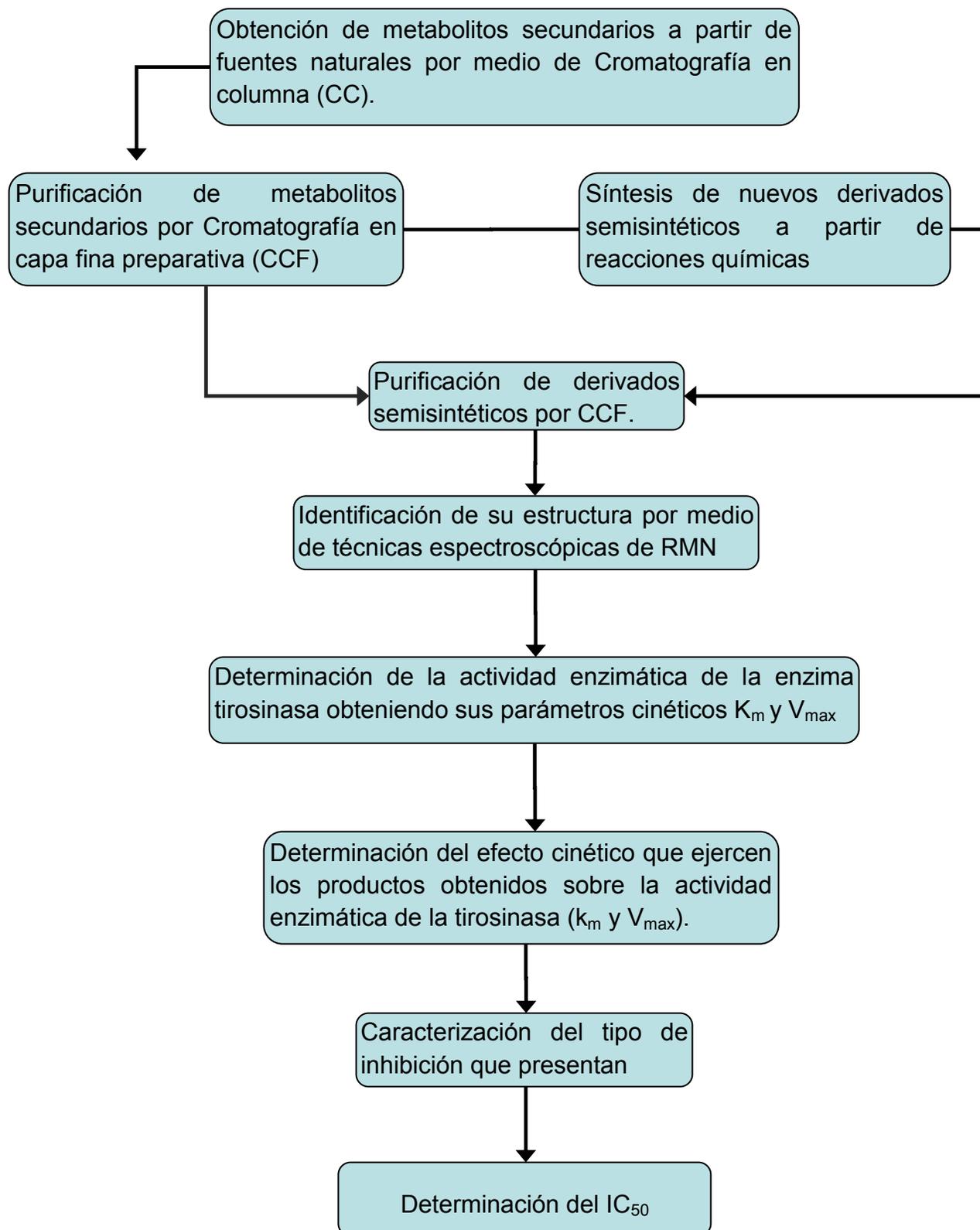


Figura 15. Quelatación de los Cu²⁺ presentes en el sitio activo de la tirosinasa (Xie, Li-Ping., et al., 2002)

CAPÍTULO II

Desarrollo Experimental

2.1.- ESQUEMA DE TRABAJO GENERAL



2.2.- MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS

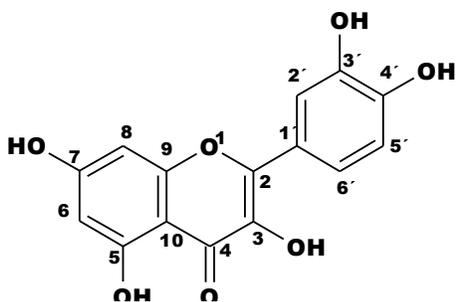
2.2.1.- Parte orgánica

2.2.2.- Métodos de separación: Los flavonoides descritos en este estudio fueron aislados y purificados mediante cromatografía en columna rápida empacada con gel de sílice (230/400 mesh) y CCF, los derivados semisintéticos por cromatografía en capa fina preparativa realizada con cromatoplasmas ALUGRAM SIL 100G/UV₂₅₄ 20 X 20cm y 1.0mm de espesor marca macherey-nagel. Durante el fraccionamiento y el transcurso de las reacciones, se realizó monitoreo continuo por cromatofolios de sílice gel SIL 100G/UV₂₅₄ 20 X 20cm y 0.20mm de espesor marca macherey-nagel, con observación directa por exposición a la luz UV con longitud de onda de 254nm y el revelado se realizó por aspersion con una solución de sulfato sérico en ácido sulfúrico.

2.2.3.- Identificación de los compuestos: Los flavonoides y derivados semisintéticos utilizados en este estudio se identificaron por medio de técnicas espectroscópicas de RMN ¹H y ¹³C

2.3.- Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona)

Se utilizó quercetina comercial y su espectro de RMN ¹H fue obtenido en un trabajo anterior. (Xinastle C. Carlos., 2009).



Espectro 1

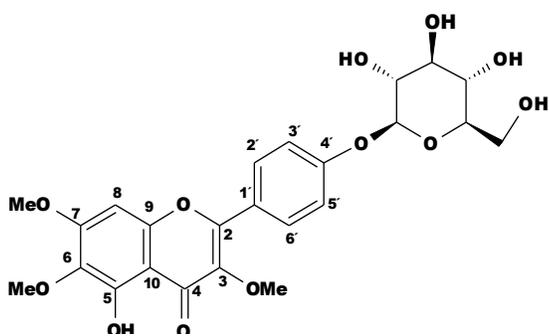
RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃ + DMSO, δ (ppm): 6.28 (1H, d, J= 2.1 Hz, H-6), 6.42(1H, d, J= 2.1 Hz, H-8), 6.96 (1H, d, J= 8.7 Hz, H-5'), 7.65(1H, d,d, J= 2.1, 8.7 Hz, H-6'), 7.77(1H, d, J= 2.1 Hz, H-2').

2.4.- Aislamiento de pendulina

2.4.1.- Materia vegetal: La planta *Brickellia pendula*, fue recolectada en el Km 45 de la carretera México Puebla el día 22 de septiembre del 2008, la planta fue identificada por comparación con una muestra del herbario.

2.4.2.- Extracción y purificación: Las hojas secas de *Brickella pendula* se dejaron secar a temperatura ambiente obteniéndose 377g de material seco el cual se maceró en 7L de metanol durante 1 día. Después por filtración se separó el disolvente del material vegetal. El disolvente se concentro a sequedad mediante destilación a presión reducida, obteniendo 19.5g de extracto seco, el cual tenía un color verde. Éste extracto se disolvió en una pequeña cantidad de acetona y se adsorbió en gel de sílice 35/70. Posteriormente se evaporó el disolvente y el extracto ya adsorbido en la sílice se dispuso en una columna de vidrio empacada con 500g de gel de sílice 230/400. Enseguida se inició la elución con mezclas de hexano-acetona de polaridad creciente, de dicha cromatografía se obtuvieron 130 fracciones, de donde se agruparon de la fracción 90-130 las cuales se concentraron a sequedad, obteniendo 7g de un sólido de apariencia verdosa. Lotes de 100mg, se disolvieron en una mezcla AcOEt/metanol y se purificaron en placas preparativas de 1.0 mm de espesor, utilizando una mezcla de diclorometano/metanol (9:1) para efectuar la elución, obteniendo un sólido de color amarillo con punto de fusión de 213-215⁰C.

Espectro 2

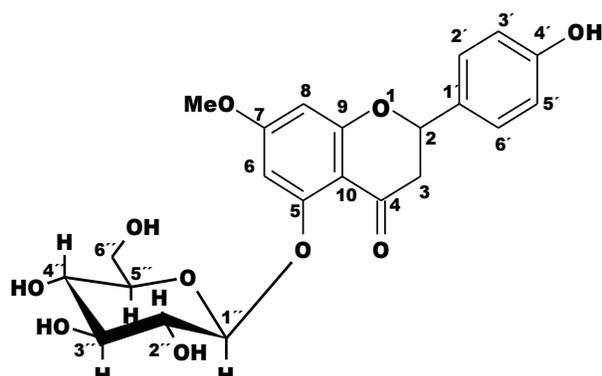


RMN ¹H, 300 MHz, DMSO, δ (ppm): 12.54 (1H, s, C₅-OH), 8.06 (2H, d, J= 9.0Hz, H-2', H-6'), 7.21 (2H, d, J= 9.0Hz, H-3', H-5'), 6.93 (1H, s, H-8), 5.35 (1H, d, J= 4.2Hz, OH). 5.08 (1H, d.a, OH), 5.02 (1H, d, J= 5.1Hz, H-1''), 3.91 (3H, s, OMe) 3.81 (3H, s, OMe), 3.73 (3H, s, OMe), 3.1-3.5 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'').

2.5.- Purificación de sakuranina (5-glucosil-7-metil-naringenina)

Las fracciones 56-61 (305 mg) de la cromatografía del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *Ageratina havanensis*, se purificaron en tres placas preparativas de sílica gel de un 1.0 mm de espesor, utilizando una mezcla de diclorometano/metanol (9:1) para efectuar la elución, obteniendo 150 mg de un sólido de color amarillo con punto de fusión de 196-199°C

Espectro 3



RMN ^1H , 200 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm):
9.65 (1H, s, C₄-OH), 7.31 (2H, d, J=8.6Hz, H-2', H-6'), 6.77 (2H, d, J=8.6Hz, H-3', H-5')
6.50 (1H, d, J=2.4Hz, H-6), 6.30 (1H, d, J=2.4Hz, H-8), 5.40 (1H, d,d, J=13.2, 3.0Hz, H-2)
2.65 (1H, dd, J=3,17Hz, H-3) 3.0-3.7 (6H,m, glucosa) 3,77 (3H, s, OMe).

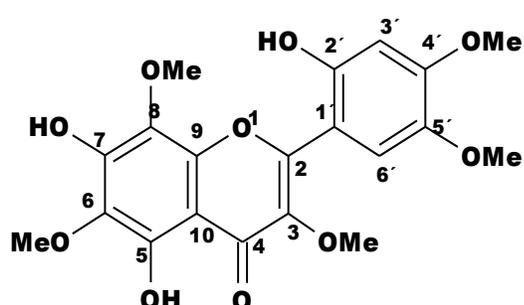
Espectro 4

RMN ^{13}C , 200 MHz, CDCl_3 , δ (ppm): 78.6(C-2), 44.6(C-3), 190.4(C-4), 160.2 (C-5), 97.9 (C-6), 165.8 (C-7), 96.1 (C-8), 164.5 (C-9), 106.4 (C-10), 128.9 (C-1'), 128.5 (C-2'), 115.3 (C-3'), 157.8 (C-4'), 143.7 (C-5'), 110.7 (C-6'), 103.0(C-1''), 73.5 (C-2''), 77.7 (C-3''), 70.0 (C-4''), 75.9 (C-5''), 61.0 (C-6''), 56.0 (C7-OMe).

2.6.- Purificación de 2', 5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona

Este flavonol fue aislado y purificado por el método que se describe en el artículo publicado por Calderón, P José., et al., 2001.

Se tomó un lote de 80mg los cuales se disolvieron en acetona y se purificaron en una placa preparativa de sílica gel de 1.0 mm de espesor, utilizando una mezcla de diclorometano/metanol (9:1) para efectuar la elución, obteniendo un sólido de color naranja con punto de fusión de 189-191⁰C.



Espectro 5

RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃, δ (ppm): 12.26 (1H, s.a, C₅-OH), 6.63 (1H, s, H-3'), 7.25 (1H, s, H-6'), 4.04 (3H, s, C₈-OMe), 3.97 (3H, s, C₄'-OMe), 3.94 (3H, s, C₅'-OMe), 3.92 (3H, s, C₃-OMe) 3.89 (3H, s, C₆-OMe).

Espectro 6

RMN ¹³C, 75 MHz, CDCl₃, δ (ppm): 145.2 (C-2), 136.2 (C-3), 177.9 (C-4), 148.0 (C-5), 130.7 (C-6), 155.8 (C-7), 127.3 (C-8), 154.0 (C-9), 104.8 (C-10), 108.4 (C-1'), 149.0 (C-2'), 102.9 (C-3'), 151.5 (C-4'), 143.7 (C-5'), 110.7 (C-6'), 62.1(C₃-OMe), 61.7 (C₆-OMe), 61.1 (C₈-OMe), 56.4(C₅'-OMe), 56.1(C₄'-OMe)

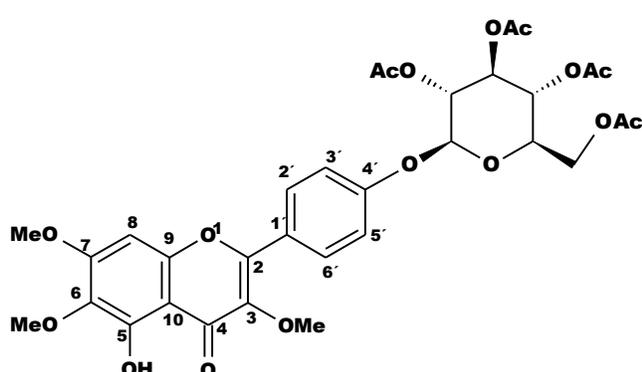
2.7.- Obtención de los derivados semisintéticos

2.7.1.- Acetilación de pendulina

En un matraz de bola de 100 ml, se disolvieron 200mg de pendulina en 2mL de piridina, posteriormente se le agregaron 2mL de anhídrido acético, la solución se dejó en agitación y a temperatura ambiente por un tiempo de dos horas y se monitoreó por medio de CCF. Al terminar la reacción se elimina la piridina y el exceso de anhídrido acético mediante una bomba de vacío. Se obtuvieron 178mg de un sólido, al cual se purificó en dos placas preparativas de silica gel de 1.0 mm de espesor, utilizando una mezcla de diclorometano/acetona (9:1). Las placas se eluyeron dos veces, obteniendo dos productos de reacción, sólidos amarillos, los cuales se identificaron como el pentacetato (p.f 176-178°C) y el tetracetato de pendulina (p.f 190-191°C),

- **Tetracetato de pendulina**

Espectro 7



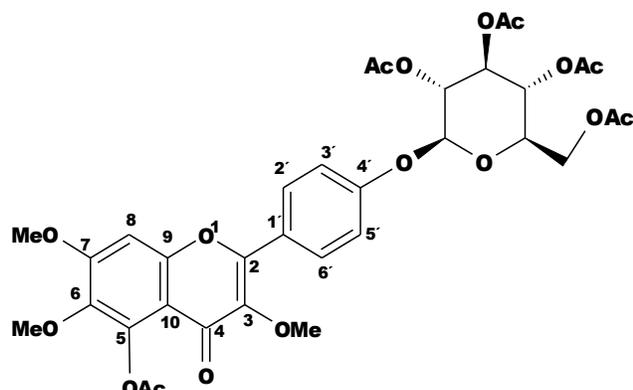
RMN ¹H, 400 MHz, CDCl₃, δ (ppm): 8.06 (2H, d, J= 9.0Hz, H-2', H-6'), 7.11 (2H, d, J= 9.0Hz, H-3', H-5'), 6.50 (1H, s, H-8), 5.19-5.35 (4H, m, H-1'', H-2'', H-3'', H-4''), 4.26 (2H, d, d, d, J= 12.4, 5.2, 2.4Hz, H-6''). 3.60 (1H, m, H-5''), 3.99, 3.92, 3.86 (9H, s, 3 x OMe), 2.09, 2.07, 2.06 (12H, s, 4 x Ac).

Espectro 8

RMN ¹³C, 100 MHz, CDCl₃, δ (ppm): 153.3 (C-2), 139.0 (C-3), 178.9 (C-4), 152.7 (C-5), 132.3 (C-6), 158.9 (C-7), 90.3 (C-8), 152.3 (C-9), 106.6 (C-10), 123.3 (C-1'), 130.1 (C-2', C-6'), 116.6 (C-3', C-5'), 158.4 (C-4'), glucosa: 98.3 (C-1''), 72.2 (C-2''), 68.1 (C-3''), 71.0 (C-4''), 72.6 (C-5''), 61.8 (C-6''), 60.9, 60.2, 56.3 (3 x OMe), 170.5, 170.2, 169.4, 169.2 (4 x C=O, acetato), 20.6 (4 x Me-acetato).

- Pentacetato de pendulina

Espectro 9



RMN ¹H, 200 MHz, CDCl₃, δ (ppm): 8.03 (2H, d, J= 9.2Hz, H-2', H-6'), 7.10 (2H, d, J= 9.2Hz, H-3', H-5'), 6.85 (1H, s, H-8), 5.16-5.35 (4H, m, H-1'', H-2'', H-3'', H-4''), 4.26 (2H, d, d, d, J= 12.2, 5.0, 2.5Hz, H-6''). 3.92 (1H, m, H-5''), 3.98, 3.86, 3.79 (9H, s, 3 x OMe), 2.08, 2.06, 2.05 (12H, s, 4 x Ac).

Espectro 10

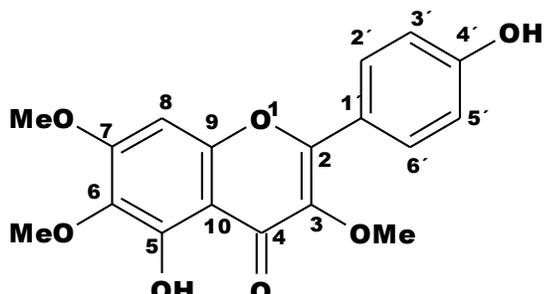
RMN ¹³C, 100 MHz, CDCl₃, δ (ppm): 153.1 (C-2), 140.9 (C-3), 178.8 (C-4), 153.1 (C-5), 141.8 (C-6), 158.2 (C-7), 97.9 (C-8), 153.6 (C-9), 116.6 (C-10), 125.5 (C-1'), 130.0 (C-2', C-6'), 116.6 (C-3', C-5'), 157.7 (C-4'), glucosa: 98.4 (C-1''), 72.2 (C-2''), 68.2 (C-3''), 71.1 (C-4''), 72.6 (C-5''), 61.8 (C-6''), 61.6, 60.1, 56.4 (3 x OMe), 170.5, 170.2, 169.5, 169.4, 169.3 (5 x C=O, acetato), 21.0, 20.6 (5 x Me-acetato).

2.7.2.- Hidrólisis de pendulina

En un matraz de bola de 100 mL, se disolvieron 500mg de pendulina en 20 mL de metanol, se colocaron en un matraz de bola de 100mL y se le agregó 10 ml de una solución de H₂SO₄ (7 mL de agua y 3mL de H₂SO₄ concentrado) se le pusieron piedras de ebullición y se dejó en reflujo por un tiempo de 24 horas. La reacción fue monitoreada por medio de CCF. Al terminar la reacción se le agregó 20mL de agua y 20 mL de acetato de etilo. Las dos fases se separan utilizando un embudo de separación de 100mL, la fase orgánica se extrae con 20 mL de acetato de etilo y la fase acuosa se desecha. La solución de acetato de etilo (40mL) se lavó con 10 ml de agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se destiló el disolvente en un rotavapor, obteniendo 475mg de un sólido el cual se purificó en cinco placas preparativas de 1.0 mm de espesor

utilizando una mezcla Hexano/Acetona (1:1). Obteniendo un sólido de color amarillo con punto de fusión de 181-183⁰C, al cual se identificó como penduletina.

Penduletina



Espectro 11

RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃ + DMSO, δ (ppm): 12.62 (1H, s.a, C₅-OH), 7.98 (2H, d, J= 9.0Hz, H-2', H-6'), 6.96 (2H, d, J=9.0Hz, H-3', 5'), 6.57 (1H, s, H-8), 3.96 (3H, s, OMe), 3.87 (3H, s, OMe), 3.84 (3H, s, OMe).

Espectro 12

RMN ¹³C, 75 MHz, CDCl₃ + DMSO, δ (ppm): 155.8 (C-2), 137.3 (C-3), 178.0 (C-4), 151.7 (C-5), 131.2 (C-6), 159.6 (C-7), 89.8 (C-8), 151.4 (C-9), 105.5 (C-10), 120.2 (C-'1'), 129.4 (C-2'), 115.0 (C-3'), 157.9 (C-4'), 115.0 (C-5'), 129.4 (C-6'), 59.8 (OMe), 59.1 (OMe), 55.5 (OMe).

2.8.- Equipo

- Rotavapor BÜCHI R-124 y baño de agua BÜCHI B-480.
- Lámpara portátil modelo Moder-UVLS-26 (254-365 nm).
- Bomba de vacío, Vacuum Pum, Hitachi Ltd.
- Parrilla de agitación Thermolyne, tipe 1000 Stir Plate, LH.
- Equipo de resonancia magnética nuclear Varian- Unity 300 MHz.
- Equipo de resonancia magnética nuclear Varian-Gemini 200 MHz.

2.9.- Parte biológica

2.9.1.- Determinación de Actividad Enzimática

Se midió la actividad enzimática de la tirosinasa indirectamente midiendo la aparición de dopacromo un compuesto colorido que absorbe a una longitud de onda de 475 nm. Como sustrato se utilizó L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina).y el como control se utilizó quercetina, un flavonol del cual ya se tienen datos reportados de que ejerce un efecto inhibidor del tipo competitivo en la tirosinasa.

Para determinar la actividad de la enzima se realizó un ensayo continuo en el cual se tomaron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a intervalos de tiempo de 1 minuto, la medición se realizó directamente de la celda en la que se realizó la reacción enzimática, en el ensayo interrumpido se utilizaron tiempos fijos de 1.5 y 2.5 minutos.

Se mantuvieron constantes los parámetros: temperatura de 35°C, y pH 6.5. Estos parámetros quedaron definidos en base a trabajos experimentales ya realizados.

Orden de los reactivos:

- Buffer de fosfatos a pH de 6.5
- Sustrato (L-DOPA)
- Enzima tirosinasa

Antes de agregar la enzima la celda se agitó suavemente con un Vórtex y se incubó por 2 minutos en el baño de agua para que los reactivos estuvieran a una misma temperatura, es importante mencionar que después de agregar la enzima se agitó nuevamente, esto se realiza para todos los experimentos.

2.9.2.- Progreso de la reacción.

El primer ensayo fue de manera continua y se realizó el monitoreo del progreso de la reacción, se tomaron lecturas de absorbancia a 475nm, que es a lo que absorbe el dopacromo, se monitoreó cada minuto hasta llegar a diez.

Ensayo	L-DOPA(10mM)		Tirosinasa 13.800 U/mL (69U)	Amortiguador de Fosfatos 0.1M a pH de 6.5
	mM	µl		
Blanco	ausente		5 µl	995 µl
1	0.25	25 µl	5 µl	970µl
2	0.28	28 µl	5 µl	967 µl
3	0.33	33 µl	5 µl	962 µl
4	0.5	50 µl	5 µl	945 µl
5	1	100 µl	5µl	895 µl
6	2	200 µl	5 µl	795 µl
7	4	400 µl	5 µl	595 µl

Tabla 1. Cantidad de los reactivos utilizados en el ensayo continuo

El siguiente ensayo de medición fue de manera interrumpida a tiempo fijo los cuales fueron de 1.5 y 2.5 minutos.

La tabla 2 muestra las cantidades que se fijaron de sustrato para determinar la actividad enzimática sin inhibidores así como la cantidad de los reactivos, la cual es la misma para todos los casos

Ensayo	L-DOPA(10mM)		Tirosinasa 13.800 U/mL (69U)	Amortiguador de Fosfatos 0.1M a pH de 6.5
	mM	µl		
Blanco	ausente		5 µl	995 µl
1	0.25	25 µl	5 µl	970µl
2	0.3	30 µl	5 µl	965 µl
3	0.35	35 µl	5 µl	960 µl
4	0.5	50 µl	5 µl	945 µl
5	1	100 µl	5µl	895 µl
6	2	200 µl	5 µl	795 µl
7	3	300 µl	5 µl	695 µl
8	4	400 µl	5 µl	595 µl
9	5	500 µl	5 µl	495 µl
10	6	600 µl	5 µl	396 µl

Tabla 2. Cantidad de los reactivos utilizados en el ensayo interrumpido

2.9.3.- TIPO DE INHIBICION

Esta parte constó de dos ensayos, la primera determinó el efecto cinético que ejercieron los inhibidores sobre la actividad de la enzima con un ensayo interrumpido y en la segunda se determinó la cantidad que se necesitaba de cada inhibidor para lograr inhibir en un 50% la actividad enzimática de la tirosinasa (IC_{50})

Orden de los reactivos:

- Amortiguador de fosfatos a pH de 6.5
- Sustrato (L-DOPA)
- Inhibidor
- Tirosinasa

Para determinar el tipo de inhibición que presentaron los flavonoides se partió de un stock 5mM para cada uno, de aquí se tomaron distintas cantidades en μ L para llegar a distintas concentraciones de cada uno de los inhibidores, la tabla 3 muestra las concentraciones utilizadas para cada caso.

Tipo de Inhibidor	Concentraciones (mM)
Quercetina	0.05, 0.075
Pendulina	0.1, 0.2, 0.3, 0.4
Sakuranina	0.05, 0.1, 0.15
2',5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona	0.1, 0.2, 0.3, 0.4
Tetracetato de pendulina	0.05
Pentacetato de pendulina	0.05
Penduletina	0.05, 0.1

Tabla 3. Concentraciones utilizadas de los flavonoides naturales y semisintéticos

Solo se muestra un ejemplo de la cantidad de reactivos que se agregaron en la celda, que es lo mismo para todos los casos, solo se fue variando la cantidad de amortiguador de fosfatos en función de la cantidad de inhibidor a probar, ya que la cantidad de sustrato designado para trabajar así como la enzima permanecen constantes (ver tabla 4).

Ensayo	L-DOPA (10mM)		Tirosinasa 13.800 U/mL (69U)	Amortiguador de Fosfatos 0.1M a pH de 6.5	Inhibidor
	mM	µl			
Blanco	ausente		5 µl	975 µl	20 µl
1	0.25	25 µl	5 µl	950µl	20 µl
2	0.3	30 µl	5 µl	945 µl	20 µl
3	0.35	35 µl	5 µl	940 µl	20 µl
4	0.5	50 µl	5 µl	925 µl	20 µl
5	1	100 µl	5µl	875 µl	20 µl
6	2	200 µl	5 µl	775 µl	20 µl
7	3	300 µl	5 µl	675 µl	20 µl
8	4	400 µl	5 µl	575 µl	20 µl
9	5	500 µl	5 µl	475 µl	20 µl
10	6	600 µl	5 µl	375 µl	20 µl

Tabla 4. Cantidad de los reactivos utilizados para la determinación del tipo de inhibición

2.9.4.- Determinación de IC₅₀

En este experimento lo que se varió fue la cantidad de inhibidor

Tipo de Inhibidor	[Inhibidor](mM)	[L-DOPA] (mM)
Quercetina	0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.140	4
Pendulina	0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.6.	3
Sakuranina	0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.3, 0.35	3
2',5,7-trihidroxi – 3,4',5',6,8-pentametoxiflavona	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9.	3
Tetracetato de pendulina	No se realizó	No se realizó
Pentacetato de pendulina	No se realizó	No se realizó
Penduletina	No se realizó	No se realizó

Tabla 5. Concentraciones utilizadas de los flavonoides naturales y semisintéticos para el IC₅₀

En la siguiente tabla se muestra un ejemplo de la cantidad de reactivos que se agregaron en la celda para cada ensayo realizado, en todos los casos es lo mismo, lo único que varía es la cantidad de amortiguador en función del inhibidor y la cantidad de sustrato.

Ensayo	[L-DOPA] mM	Amortiguador de fosfatos (pH 6.5)	Inhibidor	Tirosinasa 13,800 U/mL (69)
BLANCO	S/[s]	985µL	10µL (DMSO)	5µL
1	4mM	585µL	10µL (DMSO)	5µL
BLANCO	S/[s]	985µL	10µL	5µL
2	4mM	585µL	10µL	5µL
BLANCO	S/[s]	980µL	15µL	5µL
3	4mM	580µL	15µL	5µL
BLANCO	S/[s]	975µL	20µL	5µL
4	4mM	575µL	20µL	5µL
BLANCO	S/[s]	970µL	25µL	5µL
5	4mM	570µL	25µL	5µL
BLANCO	S/[s]	967µL	28µL	5µL
6	4mM	567µL	28µL	5µL

Tabla 6. Cantidad de los reactivos utilizados para la determinación del IC₅₀

2.9.5.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS

2.9.5.1.-Tirosinasa comercial (1.14.18.1)

Aislada de *A. bisporus*, marca Sigma-Aldrich Co, 50.000 unidades. 5370 U/mg de sólido, se conserva a menos de 0° C.

2.9.5.2.- Quercetina 5mM (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona)

Marca Sigma-Aldrich Co. Se pesan 0.0169g y se disuelven en 10 mL DMSO.

2.9.5.3.- L-DOPA 10mM (3,4-Dihidroxifenilalanina)

Marca Sigma-Aldrich Co. Se pesan 0.0197g de L-DOPA y se disuelven en un poco de agua hervida y destilada, después se afora en un matraz de 10mL.

2.9.5.4.- DMSO (Dimetil sulfóxido)

Marga Sigma-Aldrich Co.

2.9.5.5.- Amortiguador de fosfatos pH 6.5 (0.1M)

- **NaH₂PO₄ • H₂O**

Marca Mallinckrodt A.R. Se pesan 13.8g y se disuelven en un poco de agua hervida y destilada, después se afora en un matraz de 500mL (Solución A).

- **Na₂HPO₄ • 12H₂O**

Marca J.T. Baker. Se pesan 35.8g y se disuelven en un poco de agua hervida y destilada, después se afora en un matraz de 500mL (Solución B).

Se toman 68.5mL de solución A y 31.5 ml de solución B, se homogenizan bien con ayuda de un agitador magnético y se ajusta el pH a 6.5 después se afora en un matraz de 200mL.

2.9.5.6.- Inhibidores (0.5mM)

Se pesan respectivamente y se disuelven por separado en un poco de DMSO, después se aforan en matraces de 10mL cada uno.

- Quercetina 16.9mg
- Sakuranina 22.4mg
- Pendulina 25.3mg
- Penduletina 17.2mg
- Pentacetato de pendulina 35.8mg
- Tetracetato de Pendulina 33.7mg
- 2' 5,7, trihidroxi – 3, 4',5',6,8, pentametoxiflavona 21mg

2.10.- Equipo

- Balanza analítica, marca Sartorius Basic plus, modelo BP 210S, capacidad 210 g
d = 0.1 mg
- Espectrofotómetro UV/VIS, marca Pharmacia Biotech Modelo Ultrospec 2000
- Ultra congelador Scien Temp, modelo 43-1.7, a -30°C
- Micropipetas Labsystems, Finnpiquette
 - 0.5-10 μ L No 1501334*
 - 10-100 μ L No 501335*
 - 20-200 μ L No 01332*
 - 100-1000 μ L No 1501337*
- Celdas de plástico de 1.5mL marca Sigma Aldrich, modelo PlaxiBrand.
- Baño de calentamiento con temp. controlada, marca CRAFT , Modelo BP-1000
- Termómetro (-20 a 50 °C) marca Brannan (76mm Inmersión)
- Vórtex, marca Termoline, Modelo Maximix II
- Cronómetro, marca Sigma Aldrich, Modelo EAIT7.

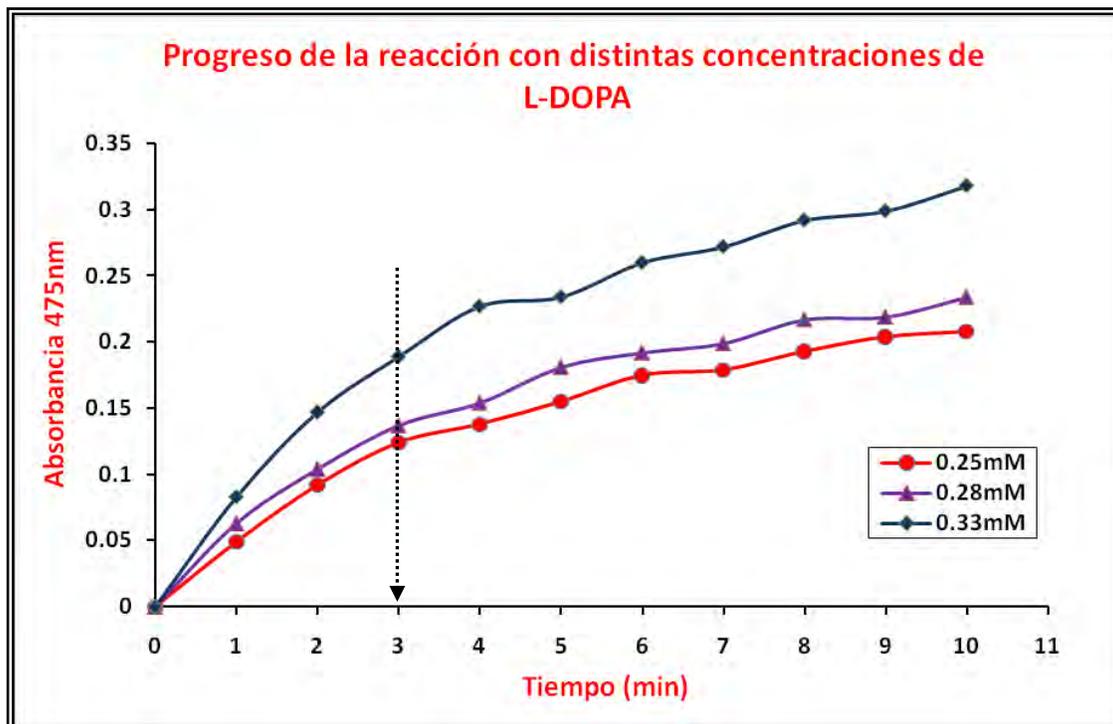
CAPÍTULO III

Discusión de resultados

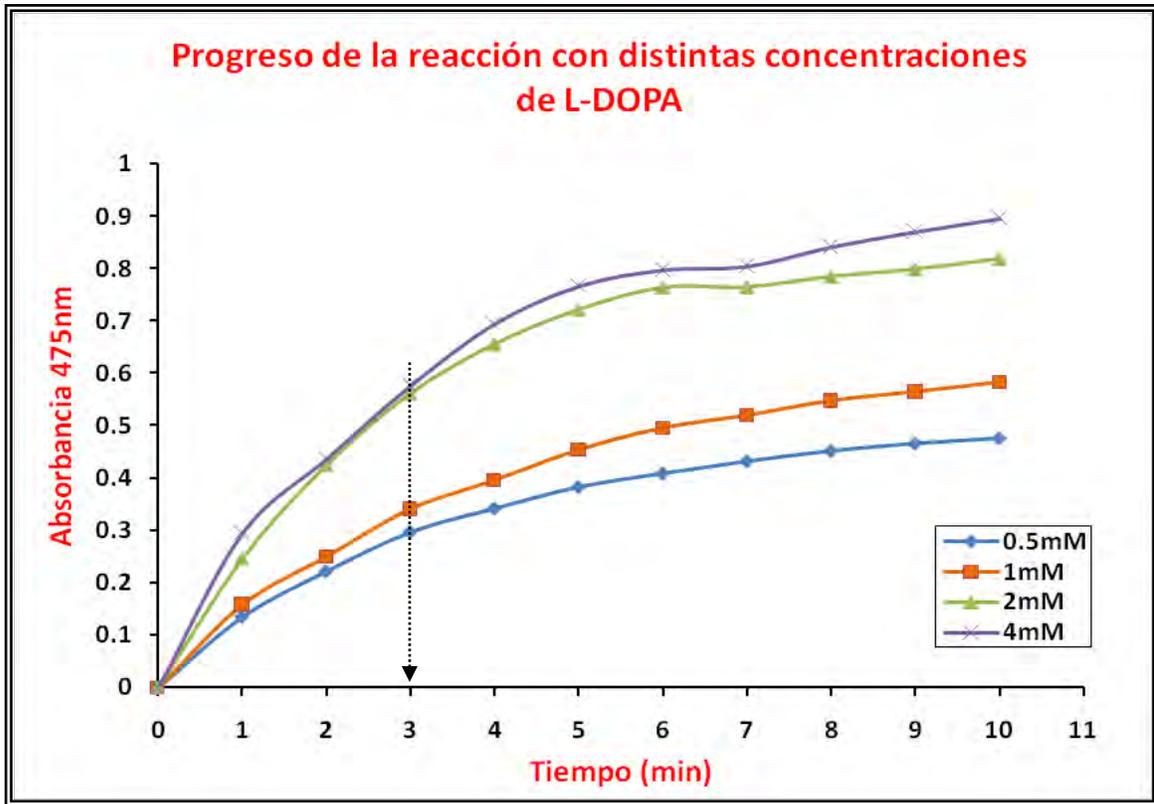
3.1.- ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA TIROSINASA

3.1.1.- Progreso de la reacción

Obtuvimos el tiempo óptimo con el cual se trabajaría, con esto nos aseguramos que el sustrato estuviera disponible para la enzima y así determinar con confiabilidad la actividad enzimática. Las gráficas 1 y 2 muestran los cambios de la absorbancia de la reacción conforme transcurre el tiempo para cada distinta concentración de L-DOPA, se puede observar que los primeros puntos aunque no presentan exactamente una tendencia lineal, son puntos que nos sirvieron para determinar que en ese lapso de tiempo (aproximadamente minuto 3) el sustrato está disponible en una alta concentración para que la enzima trabaje adecuadamente. Por arriba del minuto 3 los valores de las absorbancias casi permanecen constantes, esto nos indica que el sustrato se está agotando por lo cual este tiempo ya no sirve por que la enzima tendría muy limitado el sustrato. Los tiempos que se determinaron para realizar los ensayos fueron 1.5 y 2.5 minutos.



Gráfica 1. Progreso de la reacción enzimática (1).

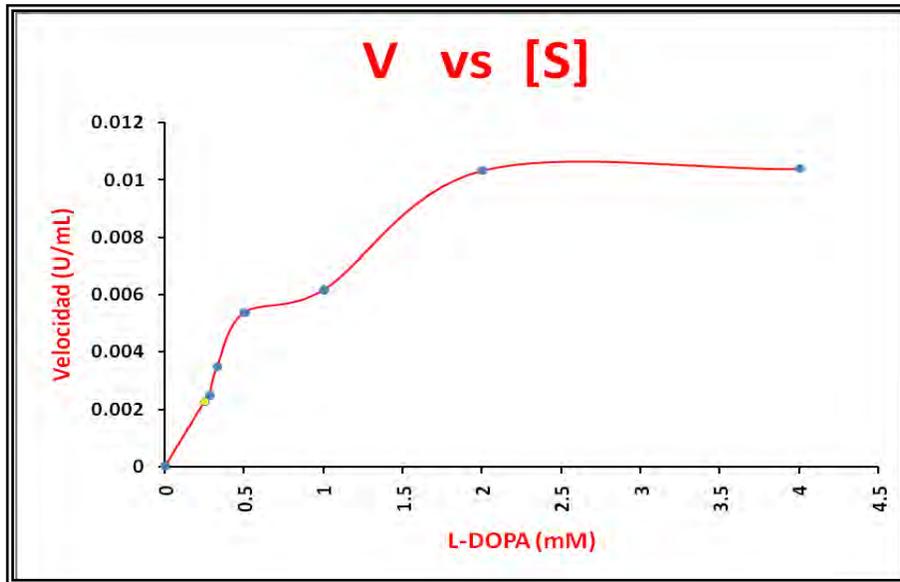


Grafica No2 Progreso de la reacción enzimática (2)

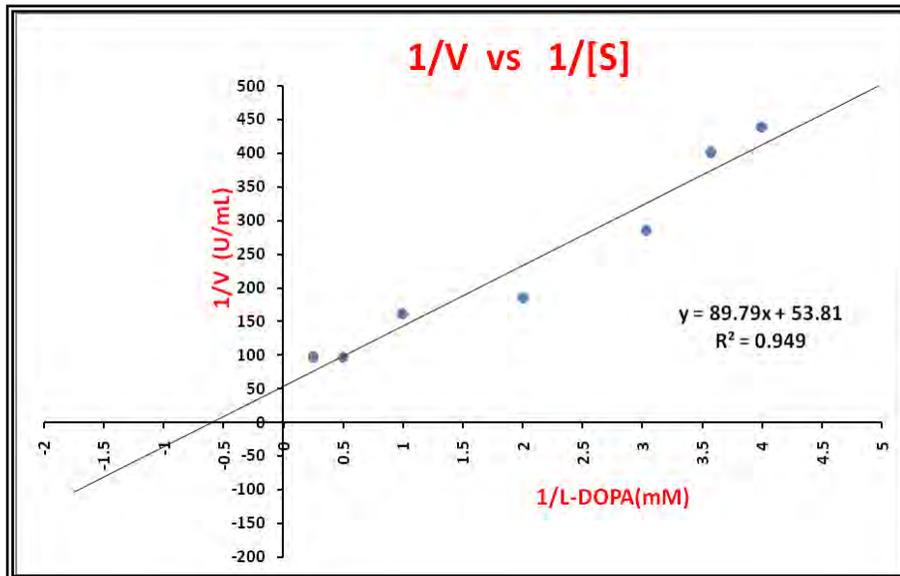
Relacionando las absorbencias obtenidas en función del tiempo con la concentración del Dopacromo, obtuvimos el valor de la actividad de la enzima y la velocidad a la cual transcurre la reacción, esto se realizó por medio de la ecuación de la ley de Lambert Beer; teniendo el coeficiente de extinción molar del dopacromo el cual es de $3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se calculó la cantidad de producto que aparece en función del tiempo, lo cual nos permitió calcular la velocidad de la reacción de la tirosinasa y se obtuvieron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , por medio de la ecuación de Lineweaver Burk

La gráficas 3 muestra una cinética parecida a la de Michaelis-Menten en donde se puede observar que cuando se fija la concentración de enzima y solo se varía la concentración de sustrato, la velocidad inicial de reacción aumenta con niveles crecientes de concentración de sustrato hasta alcanzar una velocidad máxima (V_{max}); que es cuando la enzima está totalmente saturada de sustrato, este tipo de gráfico se obtuvo para todos los casos, aunque solo se muestra ésta gráfica como ejemplo. Para obtener la V_{max} y la

constante de Michaelis (K_m) se obtuvo la doble recíproca de velocidad ($1/V$) y sustrato ($1/[S]$). El cual es un modelo propuesto por Lineweaver y Burk y da una línea recta en lugar de la hipérbola rectangular, con lo que la determinación de los valores de los parámetros cinéticos es más aproximada, y así cuando agregamos un inhibidor se pueda determinar el tipo de inhibición que presentan. (Ver gráfica 4).



Gráfica 3. Modelo de Michaelis -Menten



$K_m = 1.67\text{mM}$
 $V_{\text{max}} = 0.019\text{U/mL}$

Gráfica 4. Modelo Lineweaver-Burk

3.2.- TIPO DE INHIBICION

Se probaron siete distintos compuestos de los cuales solo cinco de ellos lograron ejercer un efecto sobre la actividad enzimática de la tirosinasa.

Como los ensayos se realizaron en distintos días, fue necesario obtener los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) en presencia y ausencia de los inhibidores, además de que fue necesario trabajar con distintas concentraciones de L-DOPA para poder definir bien, el tipo de inhibición que presentaban ya que cuando se trabaja con una sola concentración no se puede definir bien el tipo de inhibición.

3.2.1.- Quercetina

Este flavonol solo se utilizó como control debido a que ya existen muchos estudios que comprueban que ejerce una inhibición del tipo competitivo sobre la tirosinasa, se le determinó su tipo de inhibición y su IC_{50} . En donde efectivamente la gráfica 5 nos muestra una intersección sobre el eje de las ordenadas de cada una de las rectas obtenidas con distinta concentración de quercetina (0.1 Y 0.2mM) sobre la recta obtenida sin presencia del inhibidor, lo cual nos dice que es del tipo competitivo. Ya que en presencia de la quercetina los valores de K_m aumentan considerablemente, mientras que para los valores de V_{max} permanecen casi constantes. A continuación se muestran los valores.

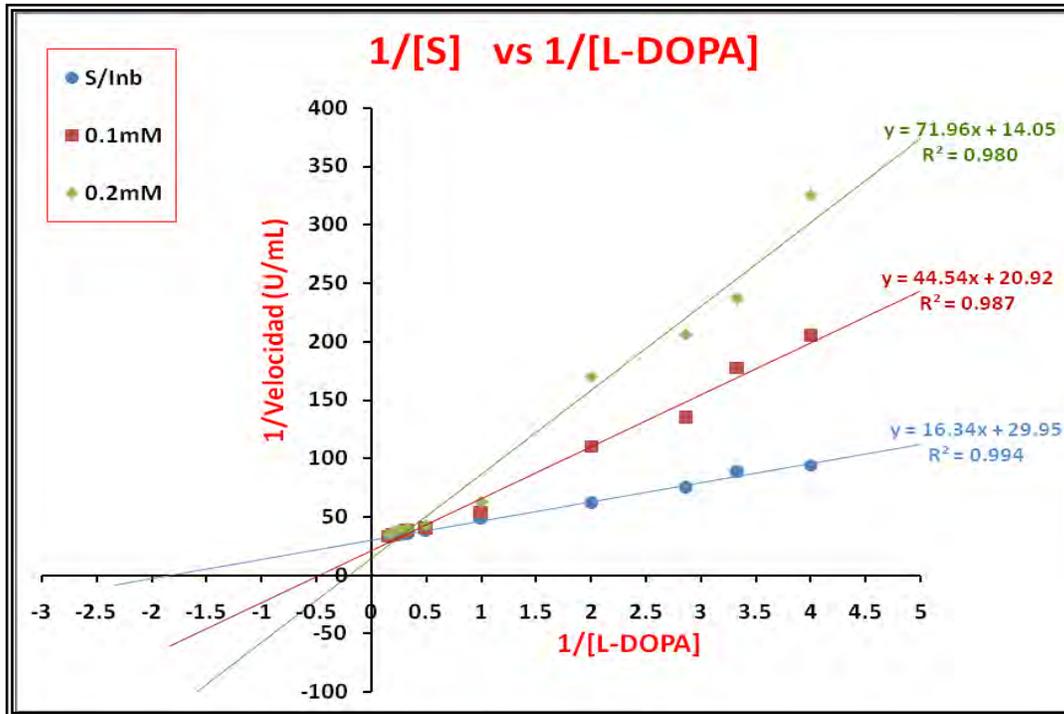
km= 0.54573 mM Vmax= 0.033 sin inhibidor

km= 2.12949 mM Vmax= 0.048 con 0,2mM

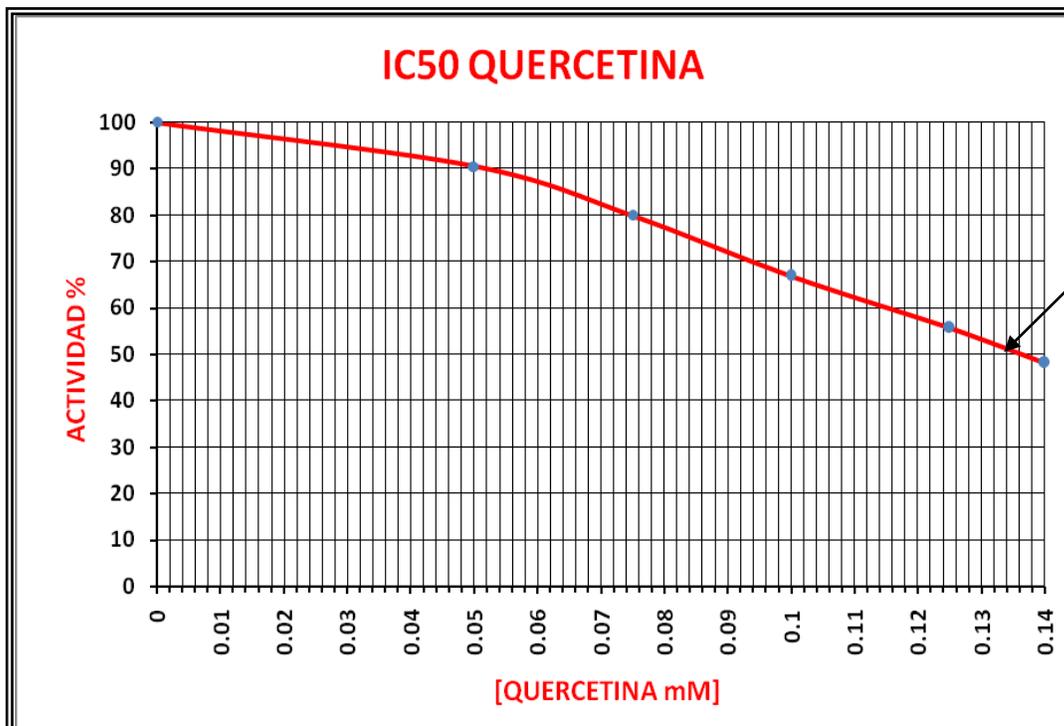
km= 5.11973 mM Vmax= 0.071 con 0,3mM

3.2.1.1.- IC_{50}

Se necesita una concentración 0.136mM de quercetina para lograr inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa en un 50%, el método con el cual se trabajó es bueno ya que el valor reportado por Chen y Kubo, 2002, fue de 0.130mM (Ver gráfica 6).



Grafica 5. Inhibición competitiva de quercetina



Grafica 6. IC₅₀ para Quercetina.

3.2.2.- PENDULINA

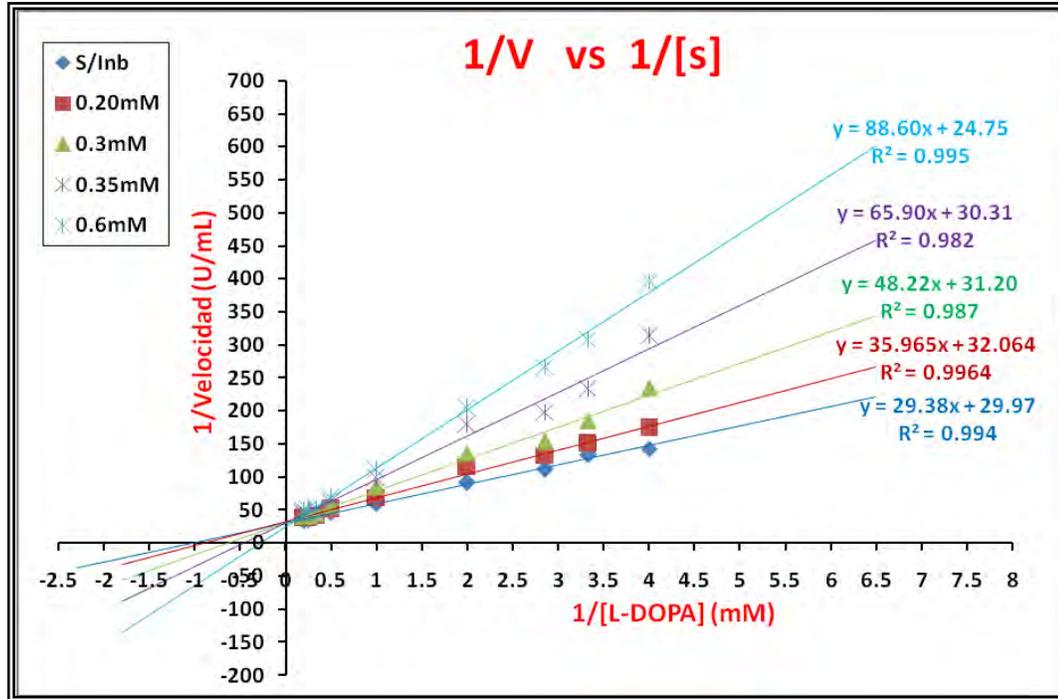
La gráfica 7 muestra que la pendulina ejerció un efecto del tipo competitivo, ya que como se explicó anteriormente al comparar los valores de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) sin inhibidor con los que contienen pendulina aumenta considerablemente la K_m y la V_{max} permanece constante. Los valores se muestran a continuación;

km= 0.980351603 mM	Vmax= 0.033358908 U/mL	sin inhibidor
km= 1.121662924 mM	Vmax= 0.031187625 U/mL	con 0,2mM
km= 1.545311799 mM	Vmax= 0.03204512 U/mL	con 0,3mM
km= 2.173923082 mM	Vmax= 0.032983706 U/mL	con 0,35mM
km= 3.579132332 mM	Vmax= 0.040394248 U/mL	con 0,4mM

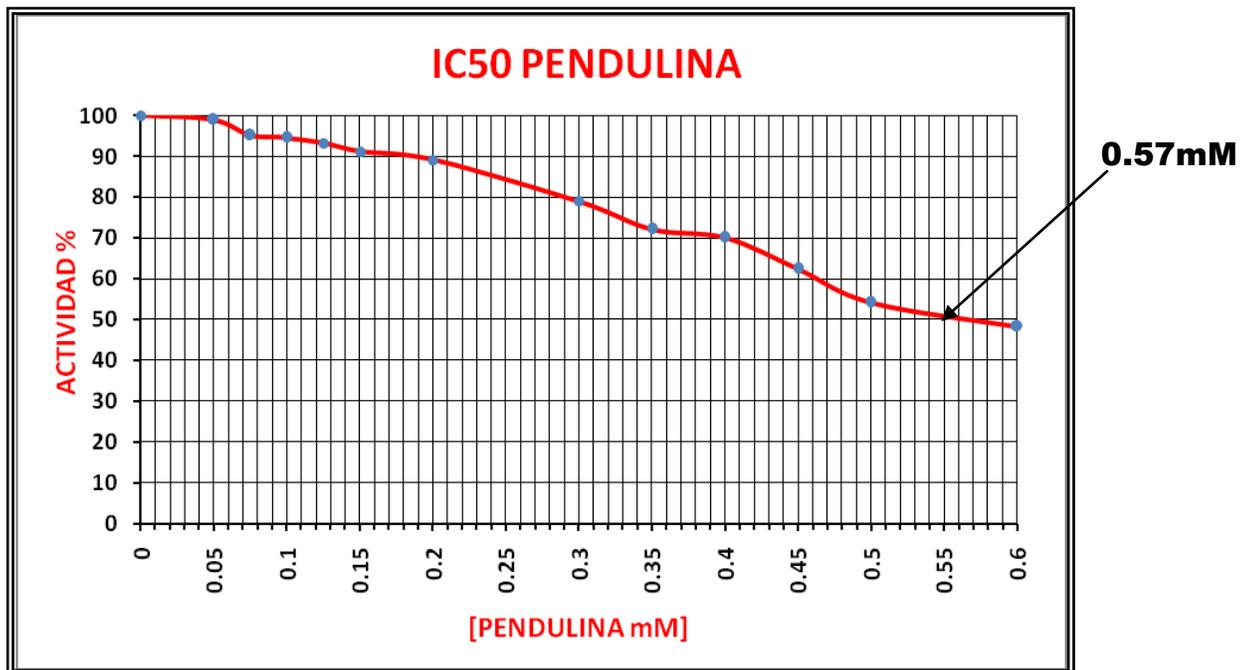
Se utilizaron cuatro distintas concentraciones de pendulina las cuales son muchísimo más altas que las utilizadas con quercetina, esto nos indica que no ejerce una inhibición muy fuerte, además de que a concentraciones menores de 0.2mM no logra inhibir la actividad enzimática, esto se puede deber a que la concentración de L-DOPA es mayor que la del inhibidor por lo que al momento de competir por el sitio activo de la enzima al estar en más baja concentración, no logra unir su estructura al sitio activo de la enzima para lograr formar el complejo **EI** y así dejar poco disponible a la enzima para formar el complejo con el sustrato y entonces la reacción se ve desplazada hacia la formación del complejo **ES** formándose así el dopacromo.

3.2.2.1.- IC₅₀

Se necesita una concentración 0.57mM de pendulina para lograr inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa en un 50%, (Ver grafica 8).



Grafica 7. Inhibición competitiva de pendulina



Grafica 8. IC₅₀ para Pendulina.

3.2.3.- SAKURANINA

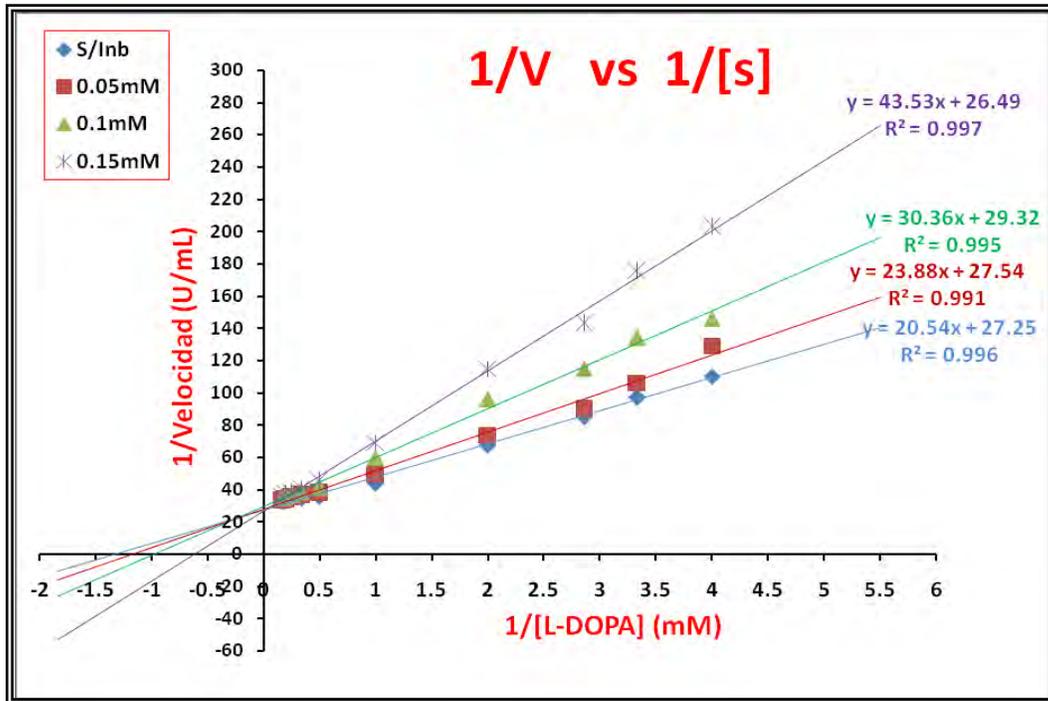
El tipo de inhibición que presentó sakuranina fue del tipo competitivo ya que se muestra la intersección de las rectas cercana al eje de las ordenadas (Ver gráfica 9), se probaron cuatro distintas concentraciones de sakuranina las cuales entre ellas eran muy cercanas, esto se debe a que a una concentración por debajo de 0.2mM no logra inhibir por las razones que ya se explicaron en la parte de resultados de pendulina, que es porque la reacción se ve desplazada a la formación del complejo ES. Por el contrario arriba de 0.35mM, existen problemas de precipitación de parte del inhibidor y que se debe a problemas de solubilidad, esto impide que las lecturas registradas sean confiables. Lo que termina de confirmar el tipo de inhibición es que los valores obtenidos de K_m aumentan mientras los de la V_{max} se mantienen. Los valores son los siguientes;

km= 0.7537	mM	Vmax= 0.03669	U/mL	sin inhibidor
km= 0.86707	mM	Vmax= 0.0363	U/mL	con 0,05mM
km= 1.03574	mM	Vmax= 0.03411	U/mL	con 0,1mM
km= 1.64282	mM	Vmax= 0.03774	U/mL	con 0,15mM

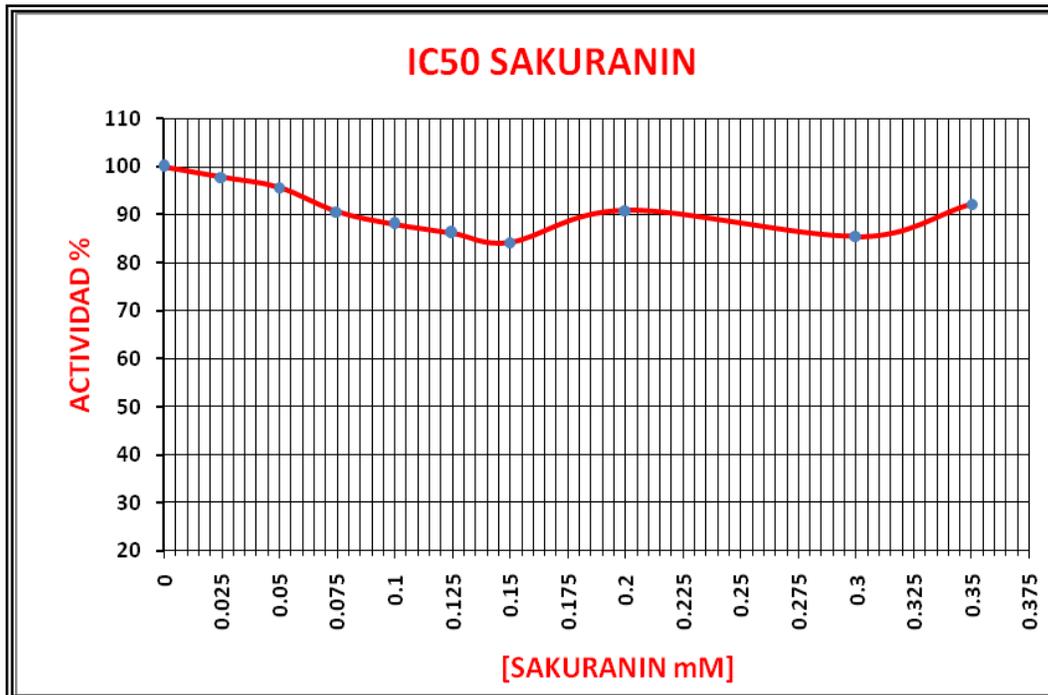
3.2.3.1.- IC₅₀

No se pudo determinar el IC₅₀ debido a que a concentraciones superiores de 0.2mM las absorbencias empiezan a aumentar, ya que al no ser tan soluble en medio acuoso puede existir una pequeña precipitación de sakuranina, lo que disminuye la interacción entre el sitio activo de la enzima y el inhibidor por lo cual ya no sigue la tendencia que se espera al medir la absorbencia y las lecturas que se registran no son confiables debido a que empiezan a subir o a bajar, aunque aparentemente a concentraciones por arriba de 0.2mM no se alcanza a observar una precipitación directa en la celda de reacción, a concentraciones de 0.3mM ya existe el precipitado lo cual provoca turbidez.

La grafica 10 muestra lo que se explicó



Grafica 9. Inhibición competitiva de sakuranina



Gráfica 10. La actividad no disminuyó, se mantiene cercana a un 80%

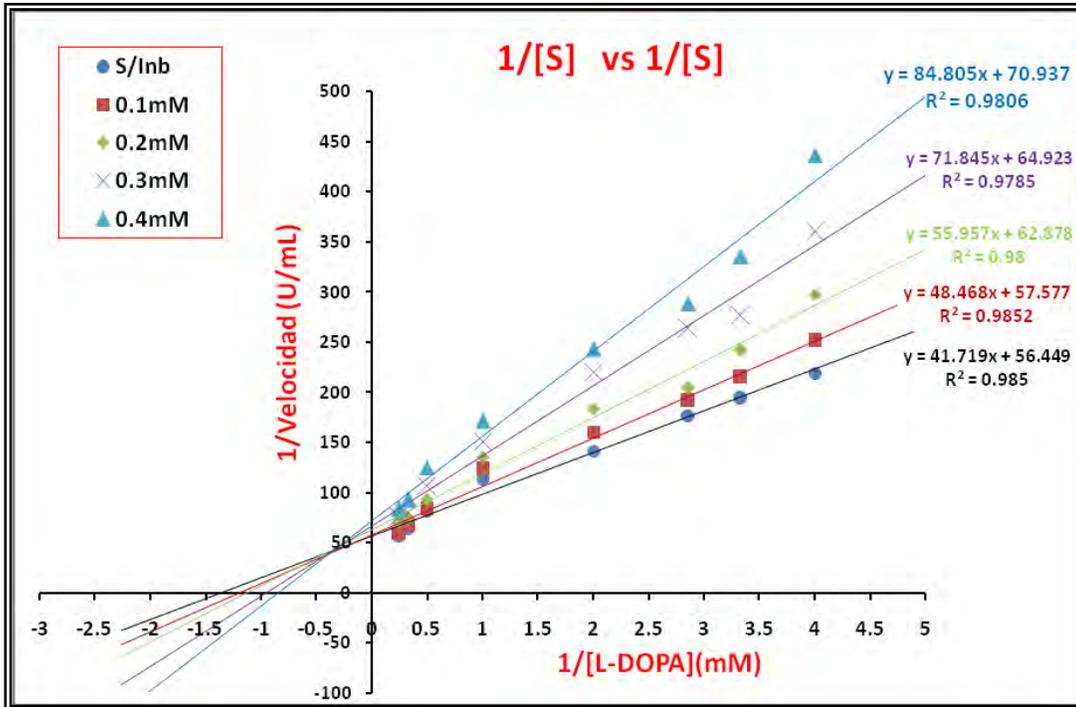
3.2.4.- 2', 5,7-TRIHIDROXI – 3,4',5', 6,8-PENTAMETOXIFLAVONA

Este flavonoide logró tener actividad inhibitoria sobre la tirosinasa, el comportamiento es también del tipo competitivo. Se muestra las intersecciones de las rectas en la gráfica 11, se utilizaron cuatros distintas concentraciones. Los parámetros cinéticos se muestran a continuación.

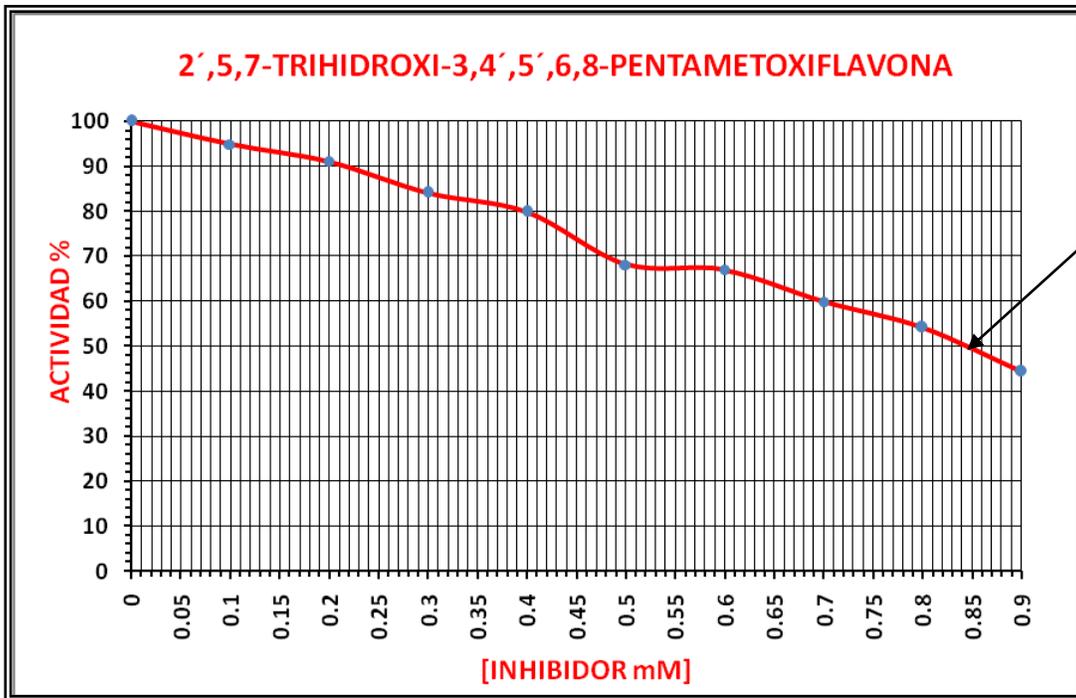
km= 0.7391 mM	Vmax= 0.017715 mM	sin inhibidor
km= 0.8418 mM	Vmax= 0.017368 mM	con 0,1mM
km= 0.8899 mM	Vmax= 0.015904 mM	con 0,2mM
km= 1.1066 mM	Vmax= 0.015403 mM	con 0,3mM
km= 1.1955 mM	Vmax= 0.014097 mM	con 0,4mM

3.2.4.1.- IC₅₀

Se necesita una concentración 0.84mM de 2',5,7-trihidroxi-3,4',5',6,8-pentametoxiflavona para lograr inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa (Ver grafica 12). Se puede deducir que el valor obtenido es por mucho mayor al de quercetina y al de pendulina, se deduce que es debido a que de los tres compuestos probados, este es el que tiene menor solubilidad en medio acuoso, por lo tanto la interacción en el medio de reacción no es tan bueno, se podría decir que no logra ocupar bien el sitio activo de la enzima por que la interacción en el medio de reacción es menor que la de los demás inhibidores.



Grafica 11. Inhibición competitiva de 2',5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona



Gráfica 12. IC₅₀ 2',5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona

3.2.5.- TETRACETATO Y PENTACETATO DE PENDULINA

De la reacción de acetilación de la pendulina, se lograron obtener dos acetatos en los que se acetilaron los grupos hidroxilo del azúcar que se encuentra en la posición 4' del anillo B de la flavona, la diferencia entre estos dos acetatos, es que en uno de ellos también se acetiló el grupo hidroxilo fenólico de la posición 5 del anillo A, el cual fue el pentacetato. Una observación importante al hacer la reacción fue que el rendimiento que se obtiene de tetracetato es mayor que de pentacetato, esto se debe a que la acetilación de un hidroxilo alifático es mucho más fácil que un hidroxilo fenólico.

No se pudo probar su efecto cinético, por problemas de solubilidad ya que son muy poco polares y aunque el stock con el que se probó fue a una concentración 0.05mM la cual es muy pequeña, al contacto con el medio acuoso de la reacción inmediatamente se empieza a precipitar causando turbidez en el medio y haciendo que las lecturas no sean confiables.

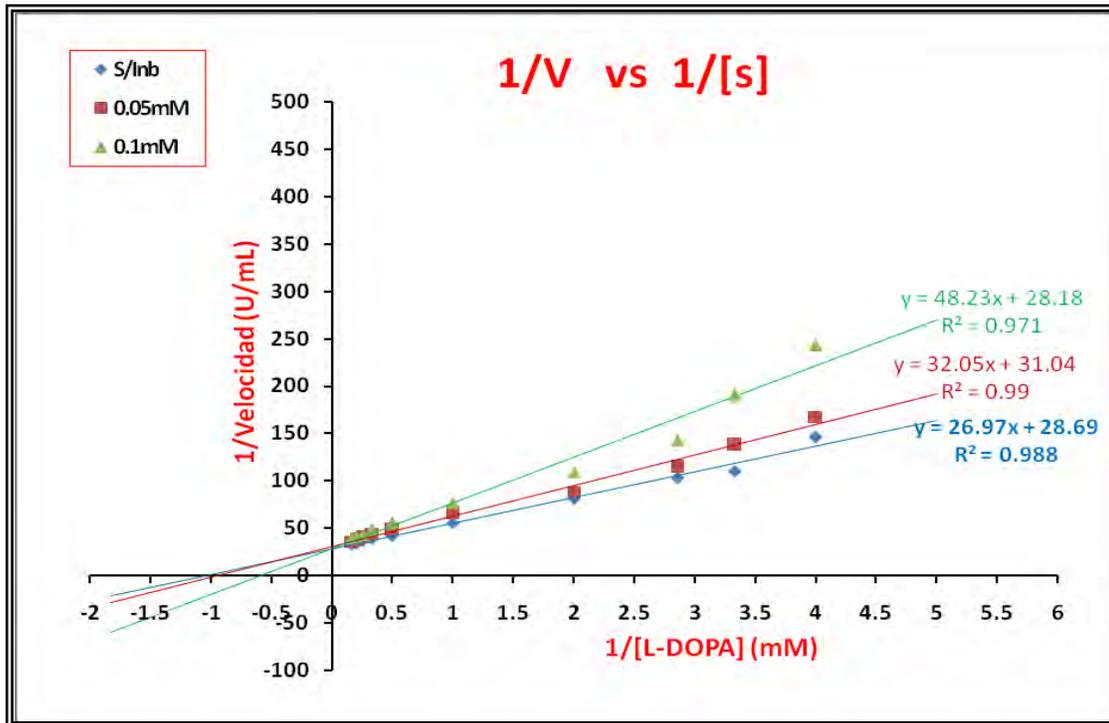
3.2.6.- PENDULETINA

Se determinó que presenta un tipo de inhibición competitiva, la gráfica 13 muestra que la recta que se obtuvo de la actividad de la tirosinasa sin inhibidor se intercepta en la ordenada al origen con las dos rectas que se obtuvieron en presencia de Penduletina, se utilizaron dos concentraciones distintas y se pudo observar que al trabajar con una concentración superior a 0.3mM la Penduletina se precipitó provocado turbidez en el medio de reacción lo cual provoca que las lecturas en el espectrofotómetro no sean confiables, esto se debe a que la penduletina no es muy polar y al entrar en contacto con el medio acuoso y al estar en una mayor proporción no logra solubilizarse. En los valores de los parámetros cinéticos obtenidos se ve un aumento en la constante de Michaelis mientras que la V_{max} permanece constante.

$k_m = 0.940048797 \text{ mM}$ $V_{max} = 0.03485535 \text{ U/mL}$ sin inhibidor
 $k_m = 1.03253866 \text{ mM}$ $V_{max} = 0.032216495 \text{ U/mL}$ con 0,05mM
 $k_m = 1.711497516 \text{ mM}$ $V_{max} = 0.03548616 \text{ U/mL}$ con 0,1mM

IC50

No se pudo determinar ya que el efecto inhibitorio que ejerce en la actividad enzimática de la tirosinasa es bajo a diferencia de quercetina y pendulina, lo cual implicaría que tendríamos que utilizar una alta concentración de penduletina para lograr inhibir en un 50% la actividad enzimática de la tirosinasa y por su poca solubilidad en medio acuoso esto nos causaría problemas de precipitación y las lecturas obtenidas no serían confiables.



Gráfica 13. Inhibición competitiva de penduletina

CAPÍTULO IV

Conclusiones

CONCLUSIONES

- ❖ Pendulina, sakuranina y 2',5,7-trihidroxi-3,4',5',6,8-pentametoxiflavona, flavonoides de origen natural, ejercieron una inhibición del tipo competitivo sobre la actividad o-difenolasa de la tirosinasa, logrando evitar la formación completa de melanoidinas.
- ❖ Los flavonoides naturales no logran ser mejores inhibidores que la quercetina, ya que este flavonol a una concentración de 0.136mM inhibe en un 50% la actividad de la tirosinasa.
- ❖ La pendulina resultó ser un inhibidor de tirosinasa mas potente que la 2',5,7-trihidroxi-3,4',5',6,8-pentametoxiflavona, puesto que presentó un IC_{50} de 0.57mM, menor al obtenido por la 2',5,7-trihidroxi-3,4',5',6,8-pentametoxiflavona (0.84mM).
- ❖ No se pudo obtener el IC_{50} de la sakuranina por su poca solubilidad en medio acuoso, lo cual causó problemas para poder determinarlo ya que existía precipitación en el medio.
- ❖ Los derivados semisintéticos; penduletina, pentacetato y tetracetato de pendulina, se obtuvieron por hidrólisis y acetilacion de pendulina.
- ❖ Penduletina ejerció una inhibición de tipo competitiva y no se determinó su IC_{50} ya que a concentraciones mayores de 0.3mM se precipitaba en el medio acuoso de la reacción.
- ❖ Pentacetato y tetracetato de pendulina no se les pudo determinar su IC_{50} y el tipo de inhibición por su baja solubilidad en agua, pues a concentraciones de 0.1mM se precipitaban en el medio acuoso de la reacción.
- ❖ Para que un flavonoide, inhiba de manera efectiva la actividad de la tirosinasa, éste tiene que tener una polaridad suficiente para que sea soluble en el medio de reacción acuoso, además debe de poseer un grupo catecol en su molécula como lo presenta la quercetina, la cual puede formar un quelato con el metal del sitio activo de la enzima.

CAPÍTULO V

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

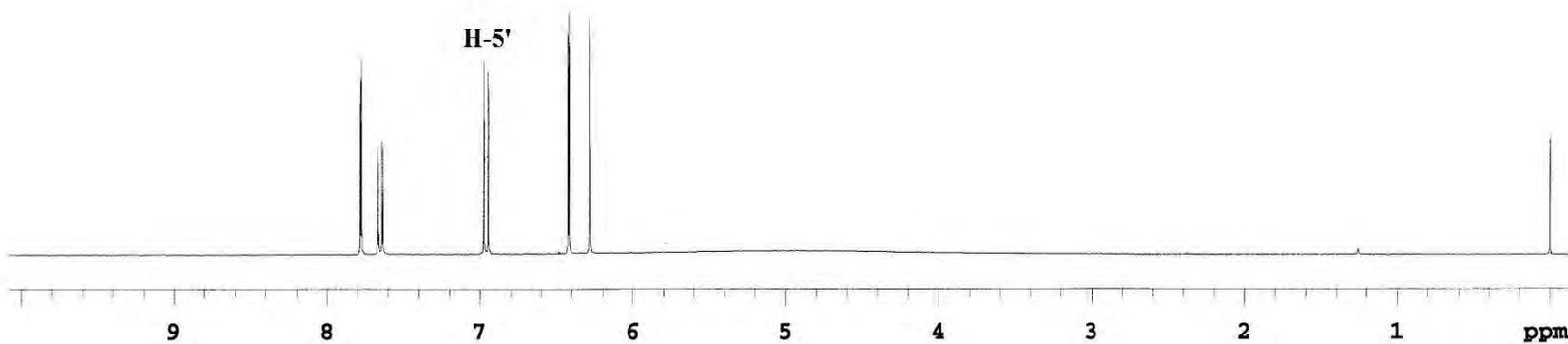
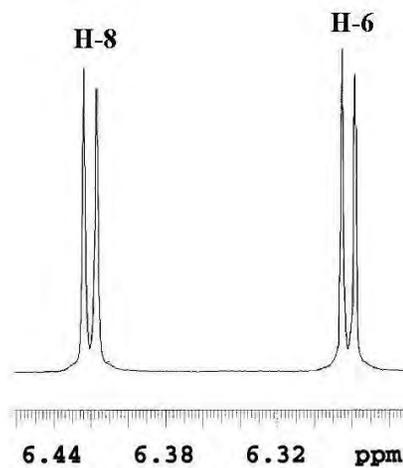
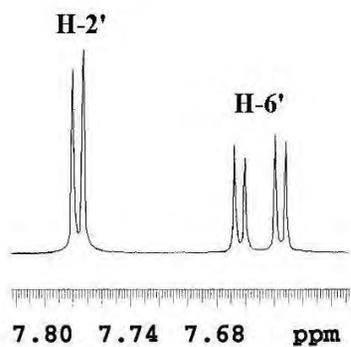
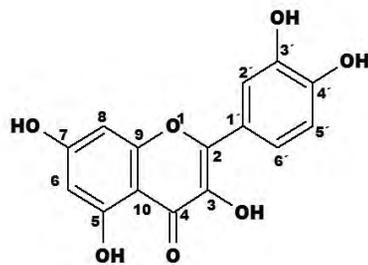
- Bartonik, J., Melanosome complexes and melanin macroglobules in normal human skin., Departament of Medical Cell Research, University of Lund, Lund, Sweden. *Acta Dermato-Venereologica* (Stockh), 1991, pp 283-286.
- Briones, U., Marisol. **Evaluación de un polifenoloxidasa en champiñones producidos en compostas con distintos champiñones.** Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F., pp. 36-40, 2008.
- Castellanos, R., Luz del Carmen. **Manual de Bioquímica 1 y Bioquímica celular.** UNAM, México, D.F., pp 23-31, 2003.
- CefTEL, Jean-Claude y Cheftel, Henri. **Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos.** Vol.1, Acribia, Zaragoza España, pp 309-317, 1992.
- Chen, Qing-Xi., and Kubo, I. **Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by quercetin.** *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4108 – 4112.
- Devlin, M., Thomas. **Bioquímica.** cuarta edición, Reverté, S.A., España, pp 431-433, 2004.
- Fennema, Owen, R. **Química de los alimentos.** Acribia, España, pp 501-503. 1993.
- Harborne, J. B.; **The Flavonoids; Advances in Research since 1986.** Chapman and Hall. London, pp 98-103, 1993.
- <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>
(24/febrero/2010, 12 :50 am)

-
-
- Jacomassi, C. Andrea., Ferreira, A. Heloiza., Gomes, Eleni., Da Silva, Roberto. **Oscurecimiento enzimático en alimentos: Ciclodextrinas como agente antioscurecimiento**. Nutr. Hosp. 2006, ISSN 0103-4235. Vol.17, n.3, pp 345-352.
 - Joung, Ha, T., Shimizu, Kuniyos., Ogura, Tetsuya. And Kubo, I., **Inhibition Mode of Soybean, Lipoygenase-1 by Quercetin**. Chemistry & Biodiversity. 2010, Vol. 7, Issue 8, pp 1893-1903.
 - Kubo, I., **Tyrosinase inhibitors from plants**. ACS Symposium series 658/1997, 24, 311-326.
 - Lee, Byong. H., **Fundamentos de la biotecnología de los alimentos**. Acribia, México, pp 34-49, 1996.
 - MacMurry, John., **Química Orgánica**., quinta edición, International Thomson México, pp 1043-1045, 2001.
 - Martínez M., Alejandro, **Flavonoides**., 2005, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, pp 5-18.
 - Mundo alimentario., Mayo/Junio 2009 (23/agosto/2010, 1:00pm) Portsmouth University, web http://www.alimentariaonline.com/media/ma030_pardeamiento.pdf
 - Peñalver, Maria J., Fenoll, Lorena G., Rodríguez-López, José N., García Ruiz, Pedro A., García Molina, Francisco., Varón, Ramón., García Cánovas, Francisco., Tudela, José., **Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase**. Journal of Molecular Catalysis, 2005, 35, 35-42.

-
-
- Peñalver, María J., Hiner, Alexander N.P., Rodríguez López, José Neptuno., García Canovas, Francisco., Tudela, José., **Mechanistic implications of variable stoichiometries of oxigen consumption during tyrosinase catalized oxidation of monophenols and o-diphenols.** *Biochim Biophys*, 2002, 1597, 1, pp 140-148.
 - Robert C. Bohinski **Bioquímica.** quinta edición, Addison Wesley Iberoamericana, S.A. E:U:A 1991 pp 195-200.
 - Seo, Sung-Yum., Sharma, Vinay K., Sharma, Niti., **Mushroom tyrosinase.** *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, pp 2837-2853
 - Xie, Li-Ping., Chen, Qing-Xi., Huang Huang, Wang, Hong-Zhong and Zhang, Rong-Qing., **Inhibitory Effects of Some Flavonoids on the Activity of Mushroom Tyrosinase.** *Biochemistry (Moscow)*, 2003, Vol. 68, number 4, pp 487-491.
 - Xinastle, C., Carlos I., **Inhibidores de tirosinasa de origen natural y semisintéticos.** Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F., 2009, pp 5-28.

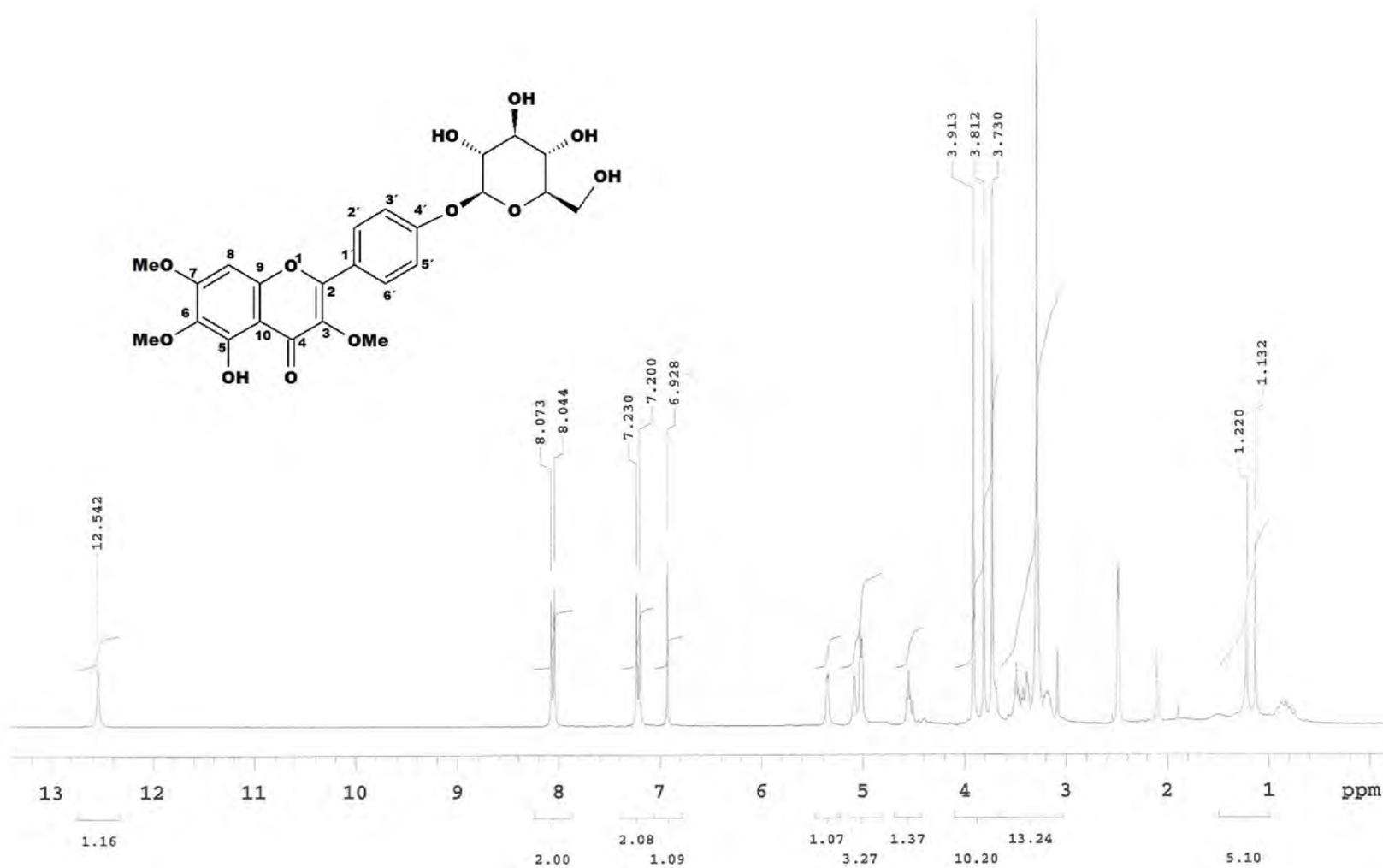
ANEXOS

ESPECTRO 1



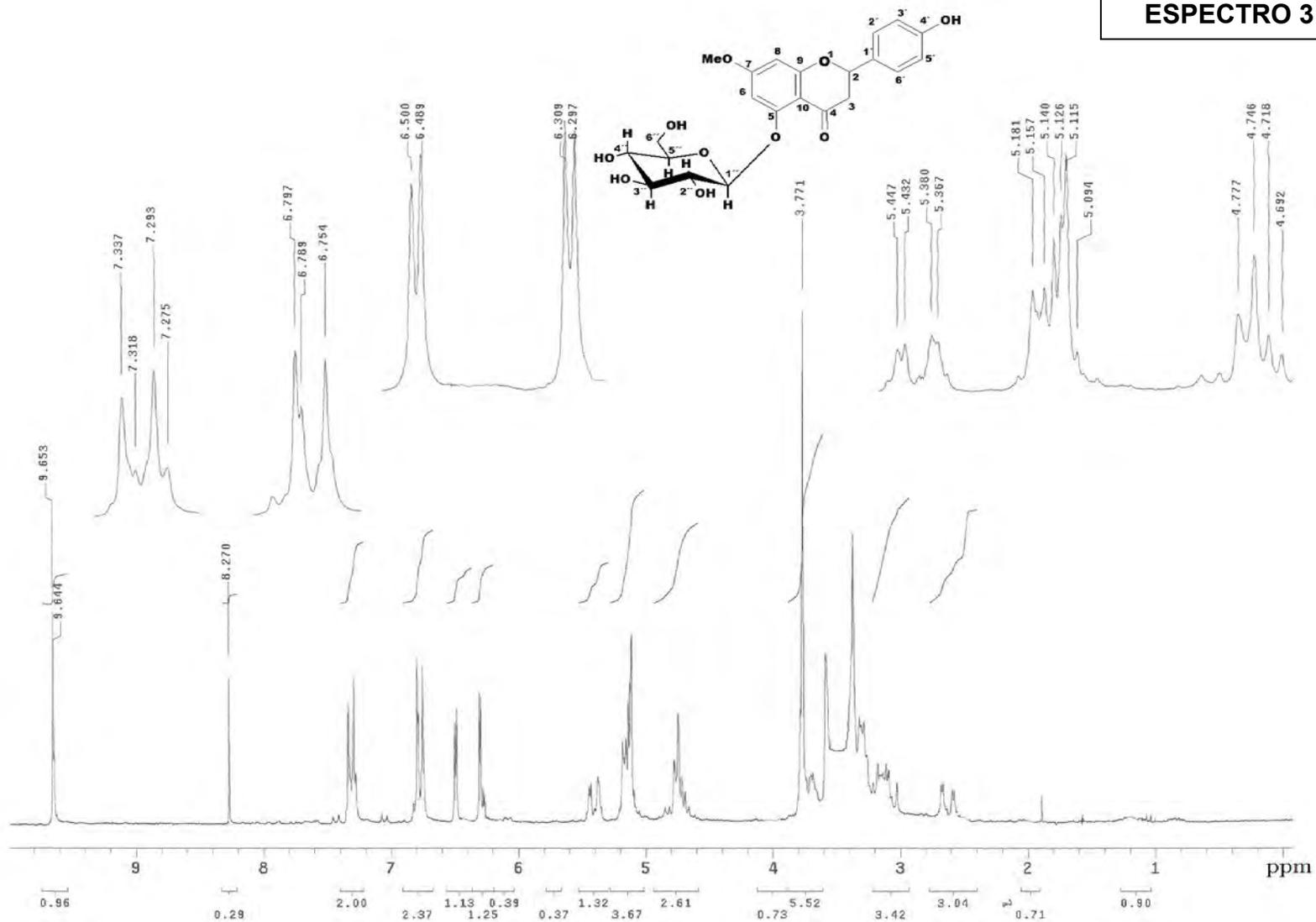
Espectro de RMN ¹H para Quercetina (3,3', 4, 5,7-pentahidroxi flavona)

ESPECTRO 2



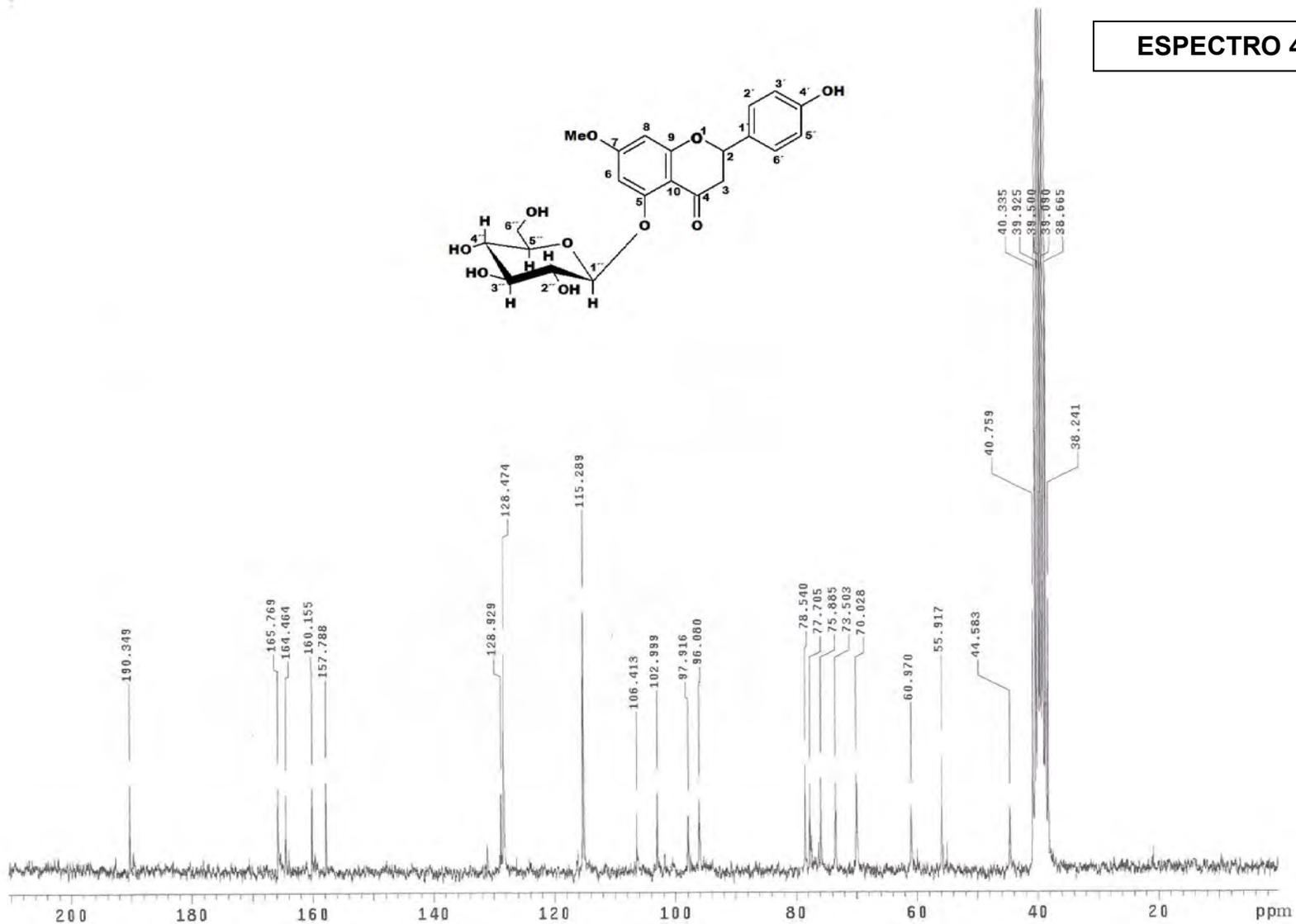
Espectro de RMN ¹H para Pendulina

ESPECTRO 3



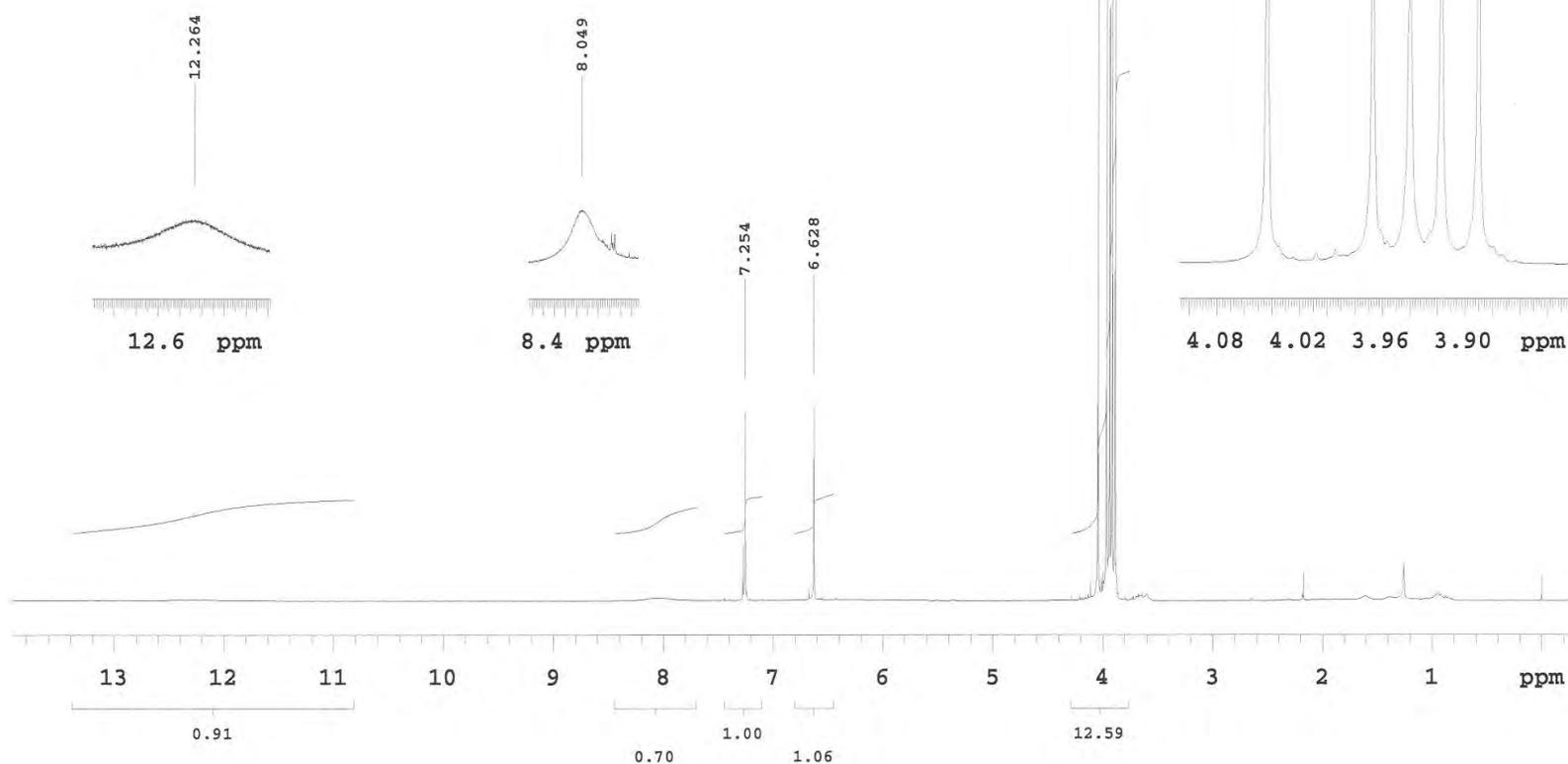
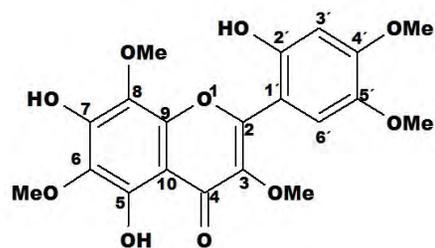
Espectro de RMN ¹H para Sakuranina (5-glucosil-7-metil-naringenina)

ESPECTRO 4



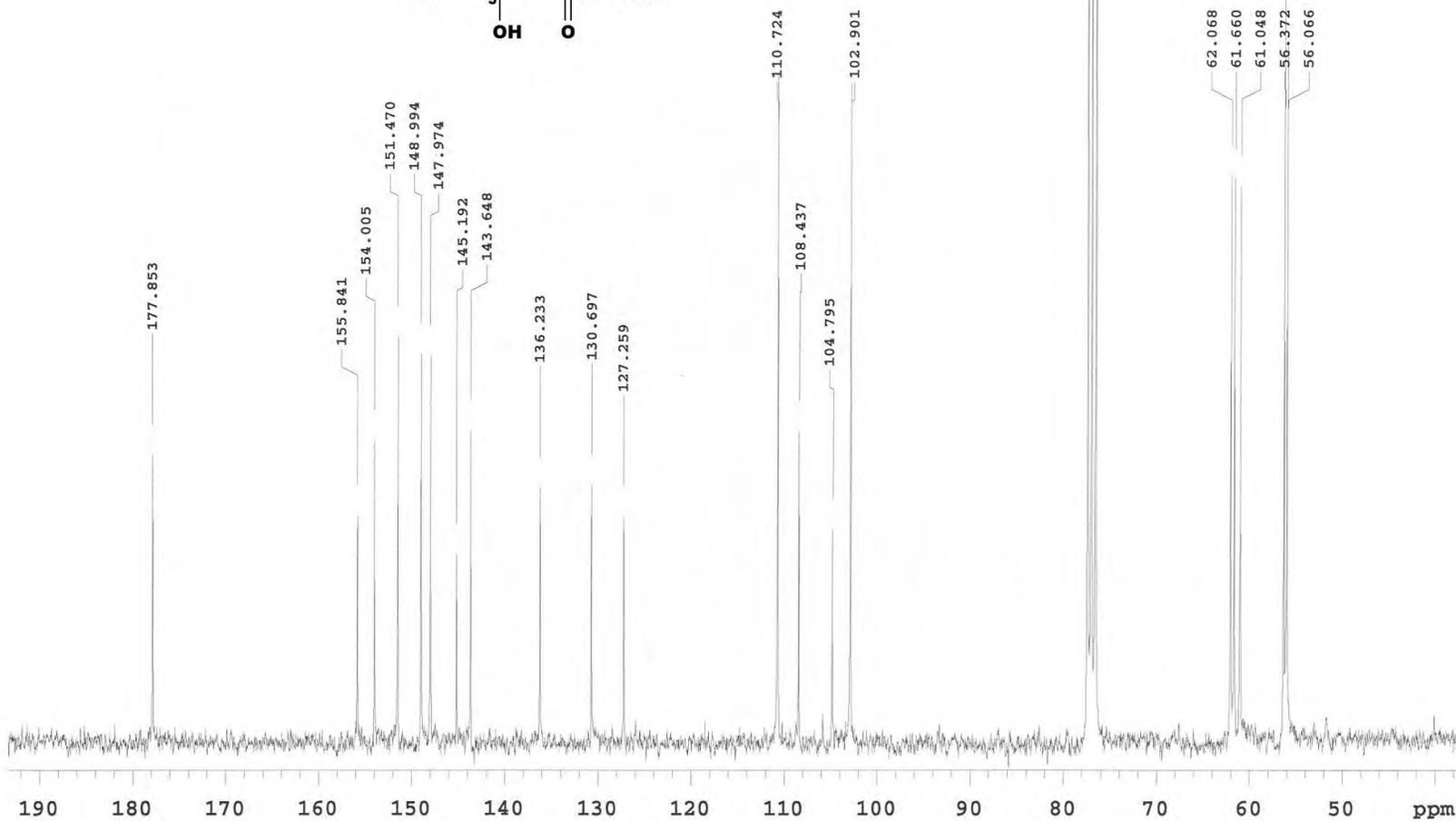
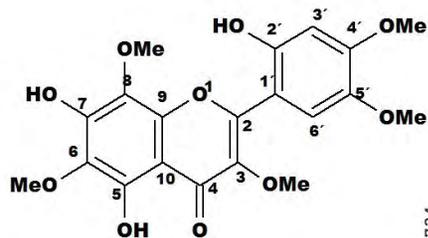
Espectro de RMN ¹³C para Sakuranina (5-glucosil-7-metil-naringenina)

ESPECTRO 5



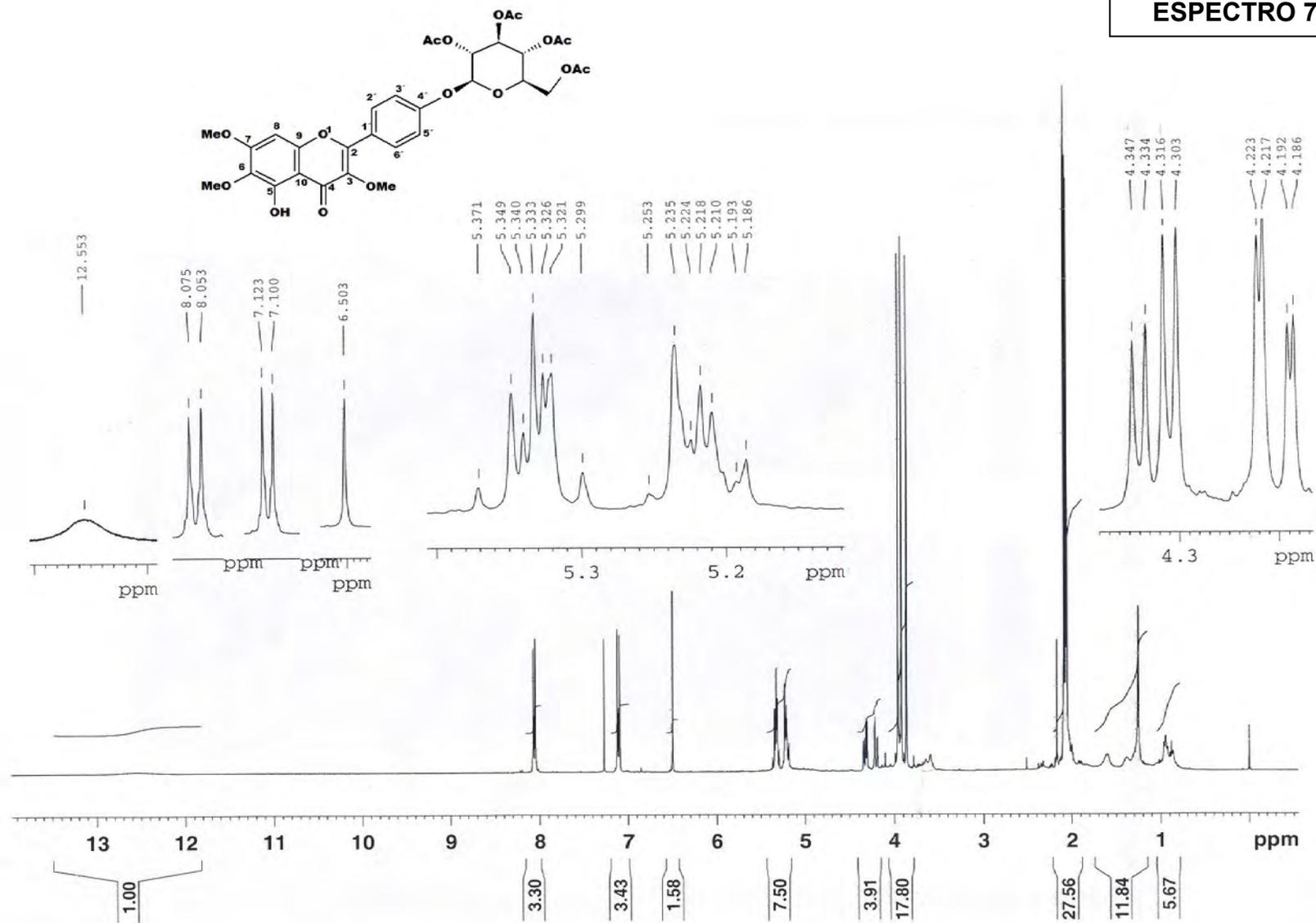
Espectro de RMN ¹H para 2', 5,7-trihidroxi – 3,4',5', 6,8-pentametoxiflavona

ESPECTRO 6



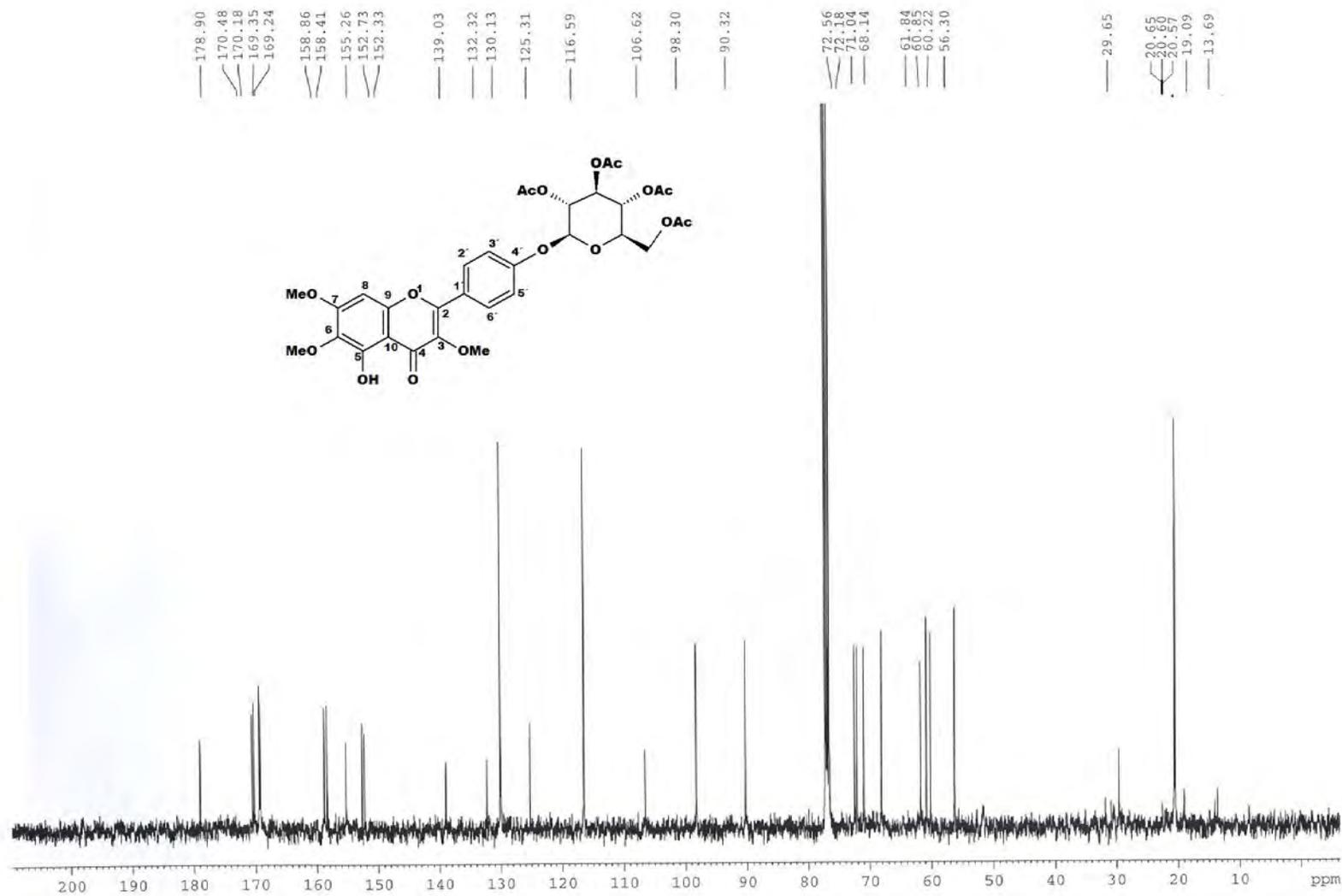
Espectro de RMN ^{13}C para 2',5,7-trihidroxi - 3,4',5',6,8-pentametoxiflavona

ESPECTRO 7



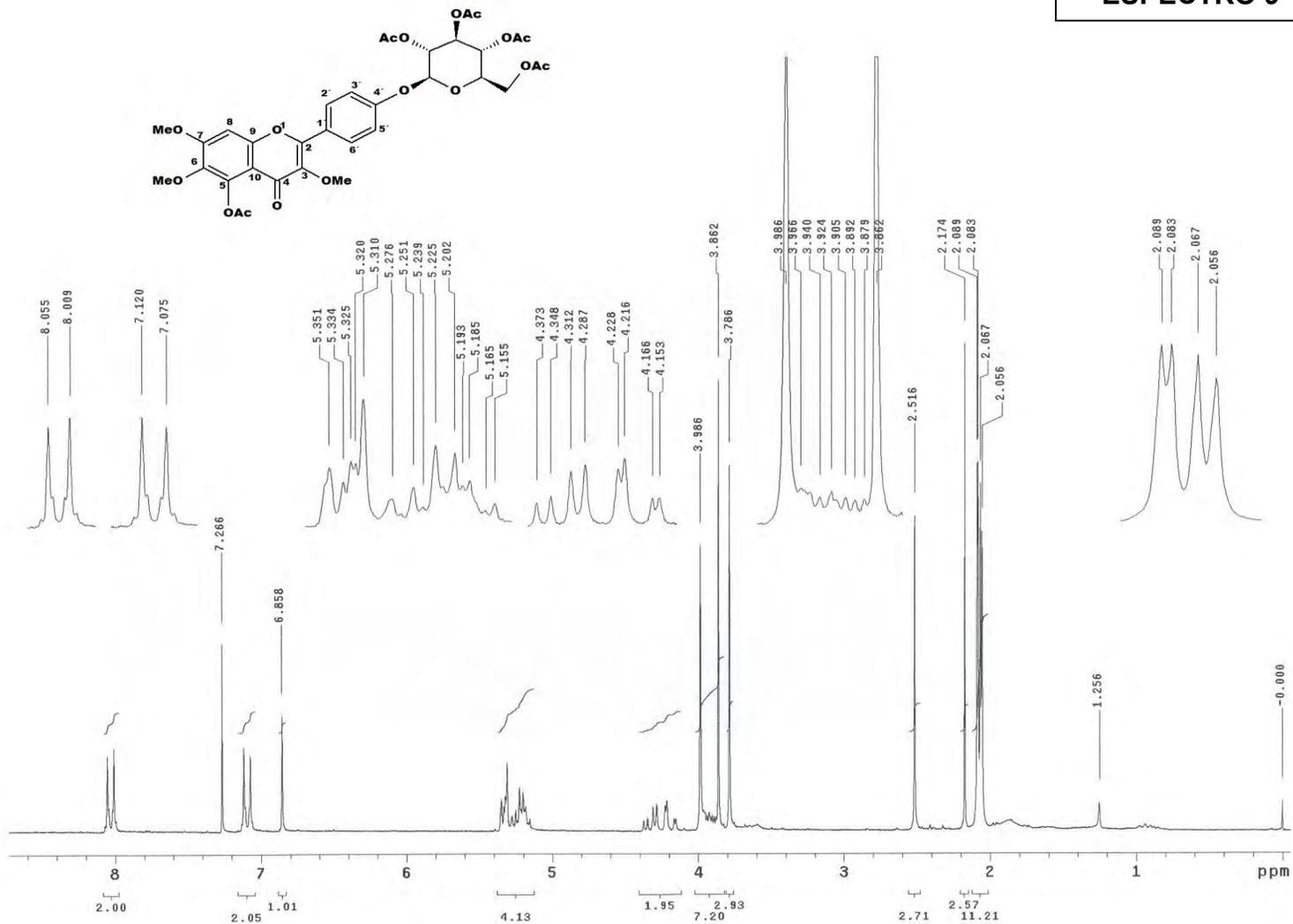
Espectro de RMN ¹H para Tetracetato de pendulina

ESPECTRO 8



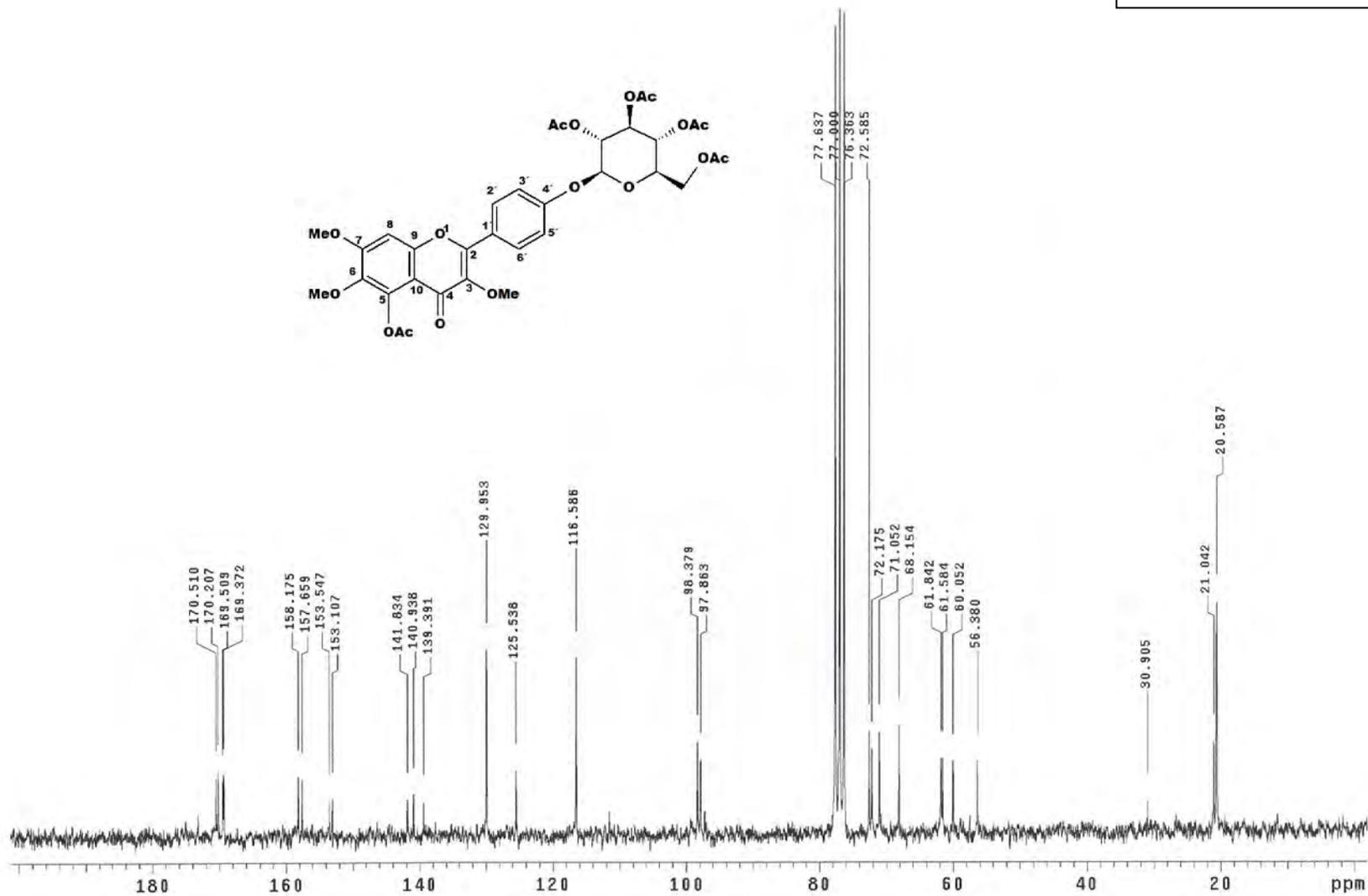
Espectro de RMN ¹³C para Tetracetato de pendulina

ESPECTRO 9



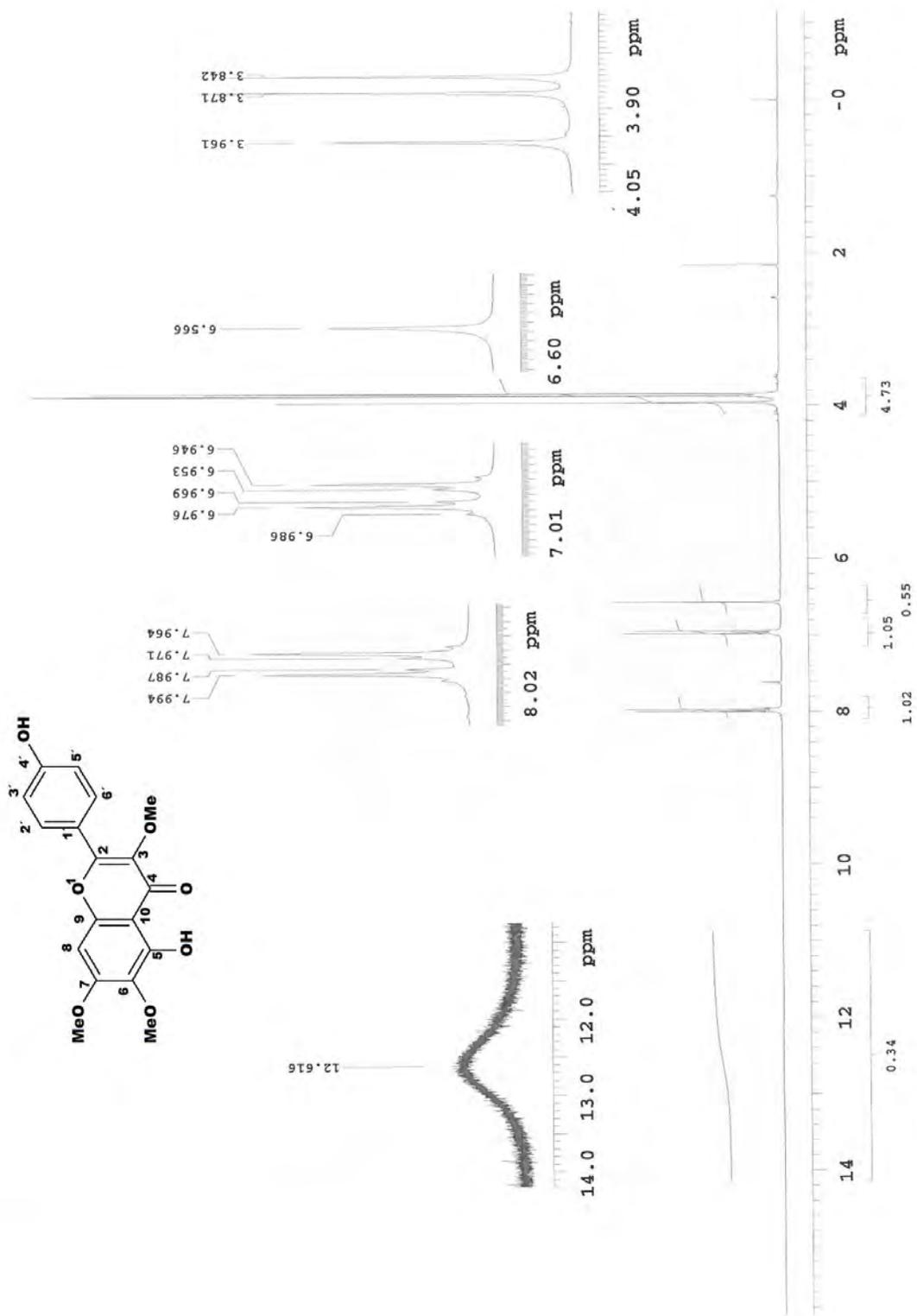
Espectro de RMN ¹H para Pentacetato de pendulina

ESPECTRO 10



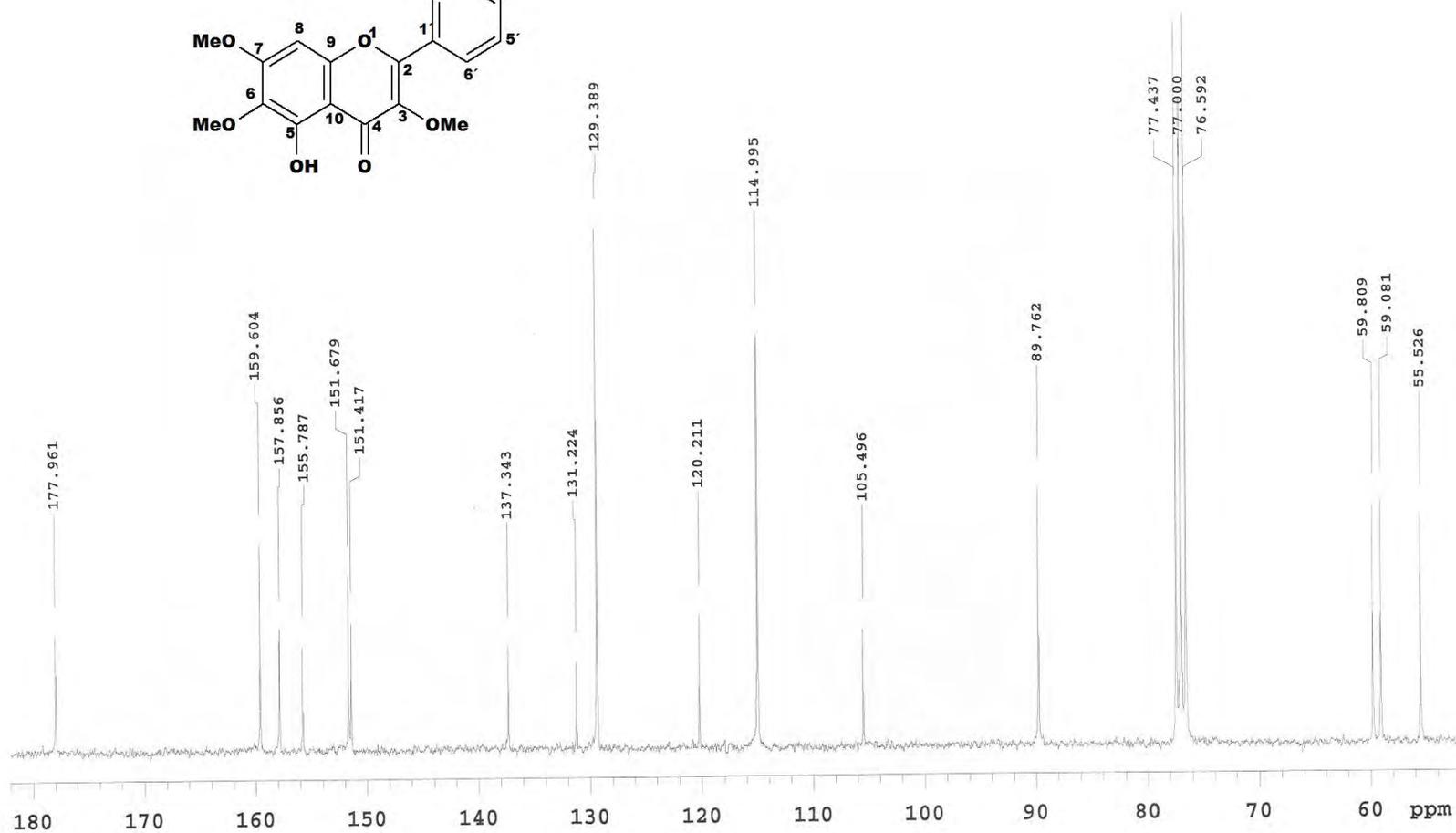
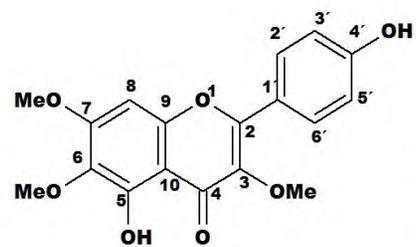
Espectro de RMN ¹³C para Pentacetato de pendulina

ESPECTRO 11



Espectro de RMN ¹H para Penduletina

ESPECTRO 12



Espectro de RMN ¹³C para Penduletina