

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

“Estudio de la capacidad antioxidante, melanogénica y
fotoprotectora de 5 extractos vegetales”

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: Víctor Jiménez Lancho

Tutores: Dr. Vicente Micol Molina

Dr. Enrique Barraión Catalán

Luz María Agulló Chazarra

Junio 2017

ÍNDICE

Resumen.....	2
ABSTRACT.....	3
1.-Introducción.....	3
1.1.-Anatomía y fisiología de la piel.....	3
1.2.-Melanocitos y melanogénesis.....	5
1.3.-Radiación UV y melanina.....	8
1.4.-Estrés Oxidativo y Envejecimiento.....	9
2.-Antecedentes.....	11
3.-Objetivos.....	13
4.-Materiales y Métodos.....	14
4.1.- Extractos vegetales.....	14
4.2.-Ensayos Bioquímicos.....	14
4.3.-Cultivo celular y mantenimiento.....	15
4.4.-Ensayo de densidad de siembra.....	15
4.5.- Ensayos de melanogénesis.....	16
4.5.1.-Determinación del tiempo de tratamiento y concentración de los controles químicos ..	16
4.5.2.-Efecto de los extractos en la melanogénesis.....	17
4.5.3.-Determinación de la dosis de los controles UV.....	18
4.5.4.- Determinación del efecto extracto-UVB.....	18
4.6.-Ensayo de fotoprotección.....	19
4.7.-Análisis estadístico.....	19
5.-Resultados.....	20
5.1.-Contenido fenólico y actividad antioxidante de los extractos.....	20
5.2.-Confluencia celular óptima.....	21
5.3.-Elección tiempo de tratamiento y concentración controles químicos.....	22
5.4.-Efecto de los 5 extractos en la melanogénesis.....	23
5.5.-Efecto del UVA y B sobre la melanogénesis y viabilidad.....	27
5.6.-Interacción del UVB con los extractos.....	29
5.7.-Fotoprotección de los extractos.....	31
6.-Discusión de resultados.....	33
7.-Conclusiones y perspectivas futuras.....	36
8.-Referencias.....	37
9.-Agradecimientos.....	40

Resumen

En estudios anteriores en el grupo se ha analizado y determinado el potencial antioxidante de extractos vegetales, como el del romero (*Rosmarinus officinalis*) o la melisa (*Melissa officinalis*), en modelos celulares de piel correspondientes a la línea *HaCat* (línea inmortalizada de queratinocitos) y la línea B16-F10 (línea de melanoma murino).

El objetivo del presente trabajo es el estudio del potencial antioxidante, inductor/inhibidor de la melanogénesis y fotoprotector de cinco extractos vegetales de origen mediterráneo y tropical.

En primer lugar, se determinó el contenido fenólico y se comprobó la actividad antioxidante mediante diferentes ensayos *in vitro* (Folin, TEAC, FRAP y ORAC). Posteriormente, se estudió en modelos celulares tanto la acción inductora/inhibidora de la melanogénesis como su capacidad fotoprotectora.

Los resultados obtenidos son positivos en los tres campos de estudio, obteniendo capacidad antioxidante, inductora de la melanogénesis y fotoprotectora. De este modo se postula una futura utilidad en la aplicación sanitaria/cosmética de los extractos vegetales estudiados.

Palabras clave: Antioxidante, extractos vegetales, inductor, inhibidor, fotoprotección y melanogénesis.

Abstract

Previous studies in our laboratory have analyzed and determined the potential of vegetal extracts like a rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) or a lemon balm extract (*Melissa officinalis*) in skin cell models corresponding to HaCat cell line (immortal cell line of melanocyte) and B16-F0 cell line (melanocytes from murine tumor cell line).

Thus, now we present the study of five vegetal extracts of Mediterranean and tropical origin for their antioxidant, inductor-inhibitor and photoprotector potential determination.

These properties were checked firstly by *in vitro* assays regarding to biochemical antioxidant potential (Folin, TEAC, FRAP and ORAC), followed by their confirmation in cellular models. Secondly, through *in vivo* assays, the melanogenesis induction-inhibition and photoprotector properties were analyzed using a cellular model.

The information obtained from the biochemical and cellular assays indicated that these five extracts have antioxidant, inductor of melanogenesis and photoprotector capacity, suggest their future application in health and cosmetic fields.

Key words: Antioxidant, inductor, inhibitor, melanogenesis, photoprotection and vegetal extracts.

1.-Introducción

1.1.-Anatomía y fisiología de la piel

La piel es un órgano vital que destaca por ser el de mayor extensión del organismo, pues recubre la totalidad de la superficie del cuerpo humano con la excepción de las superficies duras u orificios. Puede llegar a representar el 15% del peso seco del cuerpo humano [1]. Posee un papel fundamental al ser la primera y más eficaz barrera al exterior. Tiene diversas funciones entre las que se encuentra la impermeabilidad ante agresiones externas como agentes químicos, deshidratación, patógenos o radiaciones solares. También representa la localización del sentido del tacto ya que es donde se encuentran las terminaciones nerviosas y los receptores relacionados con el dolor o la temperatura.

La estructura por la que se encuentra conformada la piel posee un grosor de 2 mm [2]. Sin embargo, dicho grosor, al igual que el color derivado de la pigmentación, varía según la superficie corporal observada. Un ejemplo es el párpado, cuyo grosor es menor de 1 mm [1]. En la piel se distinguen tres capas: Epidermis, dermis e hipodermis (**Figura 1A**). Cada una de las capas posee un grosor y funciones distintas. La epidermis es la lámina que se encuentra localizada en la porción exterior del sistema integumentario, es el sistema orgánico más extenso del cuerpo, ya que se trata del revestimiento exterior, formado por la piel, sus apéndices y conductos. Está compuesto principalmente por queratinocitos y en menor medida por melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y receptores. Además, hay cuatro subláminas dentro de la epidermis (**Figura 1B**).

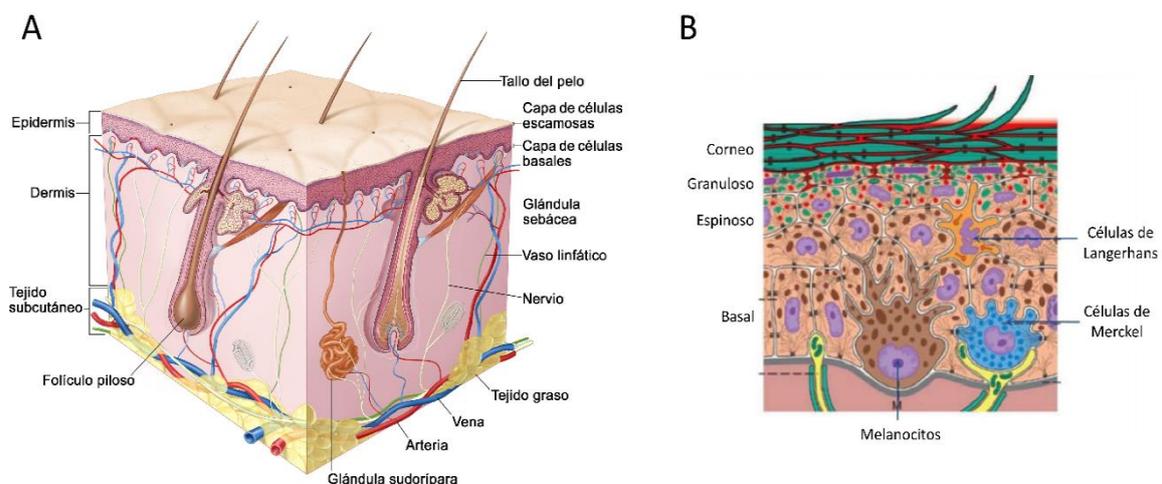


Figura 1: (A) Anatomía y capas que conforman el tejido de la piel. Se diferencian desde arriba hacia abajo las tres capas principales epidermis, dermis e hipodermis y sus correspondientes apéndices [2]. (B) Relación entre las capas dermis y epidermis y división de la epidermis en 4 subláminas.

La lámina basal, también conocida como *stratum germinativum*, es la única porción de la epidermis en la que se encuentran células con capacidad de división, estos son las células basales responsables de la constante renovación de la piel, ya que dan lugar a los queratinocitos que migrarán hacia capas exteriores. La presente lámina se encuentra compuesta por queratinocitos, melanocitos y células de Merkel, con la capacidad anteriormente comentada. Los melanocitos son los encargados de la síntesis de melanina y su transferencia a los queratinocitos, mediante las prolongaciones que extienden como vía de transferencia. Esto supone el inicio de la transformación de los queratinocitos hasta convertirse en las células protectoras de las radiaciones [3]. En paralelo a la incorporación de la melanina, los queratinocitos migran hacia las capas más externas de la piel en el proceso de queratinización y renovación celular.

Este proceso consta de dos fases:

- 1.-Una vez se ha dividido la célula basal y ha dado lugar al queratinocito, éste entra en la fase de síntesis de queratina.
- 2.-La célula sufre unos procesos celulares mediante los que se produce una senescencia programada [4]. Esta maduración se produce junto a la migración de la célula hacia el estrato córneo.

Sobre la lámina basal se localiza el estrato espinoso, que recibe este nombre debido a la morfología de las células que lo componen. Estas células, denominadas células espinosas, son los queratinocitos. La morfología se debe a los desmosomas que cubren los huecos entre dichas células, contribuyendo a la adquisición de propiedades físicas, como futura respuesta al estrés físico [1]. Con respecto a los tipos celulares localizados en esta región, se encuentran los queratinocitos y las células de Langerhans, cuya función se enfoca en la respuesta inmune.

La siguiente capa que se puede diferenciar es el estrato granuloso. Su nombre se debe a la morfología de las células que conforman esta capa. Dichas células se corresponden con los queratinocitos, que prosiguen su ascenso. Su morfología se debe a los gránulos de queratohialina que almacenan, necesarios en el proceso de queratinización que además les aporta un aumento de tamaño y aplanamiento de su estructura. Esta capa es la última región compuesta por células vivas, ya que una vez transcurrida la migración de esta lámina se produce una deshidratación, completándose de esta forma la diferenciación de los queratinocitos.

En último lugar, se encuentra el estrato córneo. Es la capa de la epidermis donde finaliza el proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos que han perdido el núcleo y orgánulos

a consecuencia del proceso de queratinización, en la que se produce la transición entre el estrato granuloso y el córneo. Las células localizadas en esta región están muertas y confieren resistencia mecánica contra agresiones externas y pérdida de agua principalmente. Por debajo de las cuatro capas/láminas de la epidermis se presenta la dermis. Ésta está formada por un tejido conectivo amorfo, caracterizado por ser englobado en su mayoría por células especializadas y es donde se encuentran las redes vascular y nerviosa. Se trata de la principal responsable de la masa correspondiente a la piel, ya que es la capa más gruesa, supone el 90% del grosor total y el 70% del peso [1]. Se encuentra compuesta principalmente por colágeno, más concretamente el tipo I aunque se puede encontrar el subtipo (III), que confiere las propiedades de resistencia al estrés[5]. Los otros componentes estructurales son las fibras elásticas constituidas por elastina y proteínas fibrilares y el ácido hialurónico en menor medida. Las propiedades conferidas por esta capa son elasticidad, resistencia a la tensión y soporte no solo estructural a la epidermis, sino nutritivo, ya que existe una estrecha relación, entre estas dos porciones debido al suministro de nutrientes llevado a cabo desde la dermis a la epidermis [2].

En último lugar se puede diferenciar la tercera capa, llamada hipodermis o tejido subcutáneo. Se encuentra formada por una red de adipocitos, colágeno y presenta un grosor variable. Aquí tiene presencia la síntesis y conversiones de hormonas, además posee la función de reserva energética a consecuencia de su alto contenido en lípidos, con su correspondiente regulación de la temperatura y protección de los órganos internos [2]. Es donde se localizan las glándulas sudoríparas, que son apéndices tubulares enrollados que producen el sudor y los folículos pilosos, que también son un apéndice de la piel con una actividad cíclica en la renovación capilar.

1.2.-Melanocitos y melanogénesis

Los melanocitos son células especializadas en la síntesis del pigmento melanina, que derivan de células embrionarias conocidas como crestas neurales [6], las cuales representan una población celular transitoria, única de vertebrados, que se origina en el ectodermo durante el desarrollo embrionario [7]. La localización de los melanocitos predomina en la membrana basal y están en contacto con los queratinocitos en sus capas más externas. Esta cercanía permite la producción del pigmento melanina y su transferencia desde los melanocitos a los queratinocitos (**Figura 2**). Los melanocitos son los encargados de ejercer a través de la síntesis de melanina, la protección ante las radiaciones ultravioletas que sufre la piel.

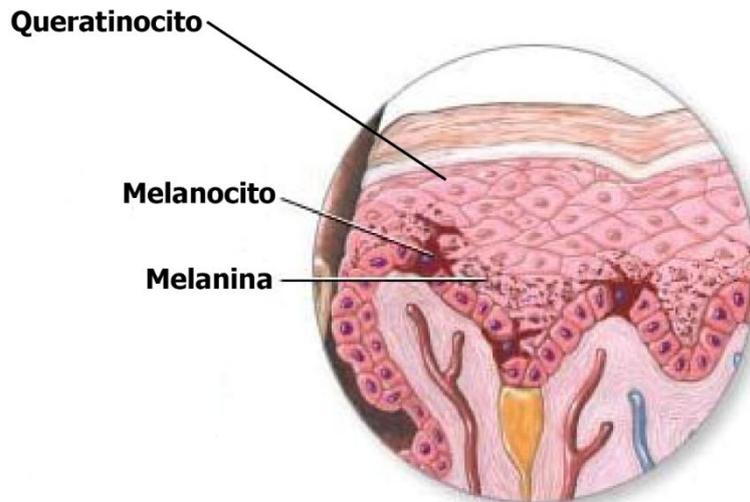


Figura 2: Ilustración de la interacción melanocito-queratinocito en la transmisión de la melanina, que confiere la propiedad protectora del queratinocito [2].

La relación entre los melanocitos y los queratinocitos supone el escudo protector contra las radiaciones, por lo que existe una estrecha red de comunicación y coordinación entre ambos tipos celulares. Una de estas vías es la capacidad que poseen los queratinocitos de regular las actividades biológicas de los melanocitos como la proliferación o el aumento en la producción de melanina, mediante factores de señalización (señalización paracrina), siendo también los propios melanocitos capaces de generar una señalización autocrina en su propia regulación [8].

La melanogénesis se define como el proceso mediante el cual los melanocitos producen melanina. Este proceso se localiza en estructuras especializadas dentro del melanocito llamadas melanosomas [6]. Existen dos tipos de melanina, la eumelanina y la feomelanina [9]. La eumelanina aporta el color característico de piel de cada etnia. Su síntesis depende de la biodisponibilidad de sustratos y de la enzima tirosinasa (TYR), de la proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TYRP 1) y de la proteína relacionada con la tirosinasa 2 (TYRP2) [10].

La síntesis de la feomelanina, comienza con una hidroxilación de la tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) por la enzima TYR, producto que rápidamente se oxida a DOPAquinona. A continuación, en presencia de la cisteína, la DOPAquinona reacciona con ésta y se produce la 3- o 5-cisteinilDOPA. Esta reacción es seguida de una oxidación y una posterior polimerización, dando lugar a la feomelanina. Este tipo de melanina posee una capacidad fotoprotectora menor que la eumelanina. En cambio, la síntesis de eumelanina se caracteriza, al producirse en ausencia de tioles, por seguir una síntesis parcialmente diferente.

En este caso, se parte de la DOPAquinona, que sufre de manera espontánea una ciclación a DOPAcromo. En el siguiente paso el DOPAcromo pierde un ácido carboxílico y genera 5,6-dihidroxiindol (DHI), que rápidamente se oxida y polimeriza para formar DHI-melanina. Pero si se encuentra presente la DOPA como tautomerasa, DOPAcromo formará DHI-2-ácido carboxílico (DHICA), siendo la DHICA-melanina (eumelanina en pasos intermedios) (**Figura 3**).

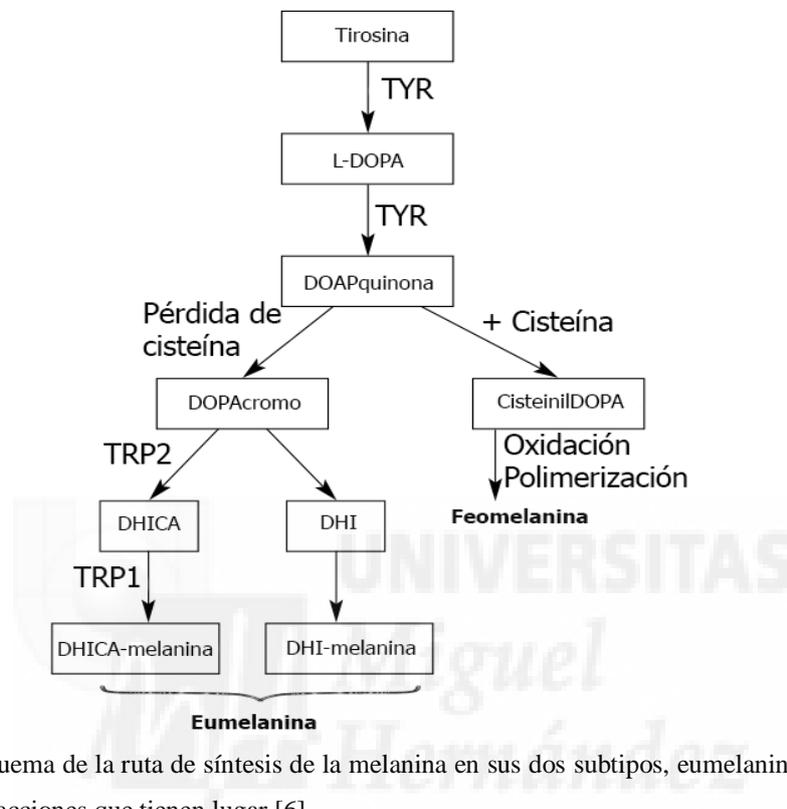


Figura 3: Esquema de la ruta de síntesis de la melanina en sus dos subtipos, eumelanina y feomelanina y las distintas reacciones que tienen lugar [6].

La feomelanina presenta una mayor actividad antioxidante frente a las especies reactivas del oxígeno y un efecto fotoprotector debido a que produce *scattering*, actúa como cromóforo absorbiendo la radiación y protegiendo de esta manera a los tejidos [6, 11]. Tras la síntesis de la melanina en los melanosomas se produce la transferencia de estas estructuras englobadas a los queratinocitos. Esto se produce mediante un sistema de vesículas que rodean los melanosomas. Una vez se encuentra esta organela con propiedad fotoprotectora en el citoplasma del queratinocito, se degrada la membrana que la rodea y se reorganizan protegiendo el material genético principalmente [12].

Existen numerosas enfermedades relacionadas con la pigmentación de la piel, afectando a un gran sector de la población. Por ello, es necesario el conocimiento de las bases celulares del entramado de la melanogénesis, para poder abordarlas desde un punto de vista biotecnológico. Un ejemplo es el vitíligo, enfermedad autoinmune en la que los melanocitos son destruidos y se pierde la pigmentación [13]. Para este tipo de enfermedades se están desarrollando

tratamientos mediante el uso de análogos de la hormona estimulante de los alfa-melanocitos, como es el afamelanotide [14], los cuales promueven la repigmentación. Además, existen anomalías relacionadas con una pigmentación excesiva como puede ser la hiperpigmentación postinflamatoria.

Por el contrario, los productos blanqueantes también se utilizan como cosméticos en la cultura asiática o en la eliminación de manchas en la piel. Esto es debido a la asociación cultural asiática de la piel clara con la belleza y aceptación [15]. Productos como Synerlight, por la compañía LIBiol, están compuestos por productos aislados de plantas, como la especie *Sophora* o el kiwi (*Actinidia chinensis*), que poseen actividad inhibidora de la tirosinasa, enzima vital en el proceso de la melanogénesis [16].

1.3.-Radiación UV y melanina

La radiación ultravioleta (UV) se encuentra localizada en el rango de longitud de onda de 100-400 nm [17]. Esta radiación UV se puede separar en distintas subradiaciones en función de su longitud de onda, según la cual tienen propiedades distintas. Las relaciones entre las magnitudes de las radiaciones se rigen mediante la ecuación de Planck, relacionando la energía de un fotón como el producto de la frecuencia y la constante de Planck ($E = h \cdot \nu$). De este modo se extrae la conclusión sobre la que, a menor longitud de onda, la radiación posee una mayor frecuencia y energía [18].

En función de la energía, la radiación UV tiene un efecto biológico distinto en el cuerpo humano. La energía que transmite la radiación se ve condicionada por la longitud de onda que posee, a menor longitud de onda mayor energía. De esta manera, la radiación UV proveniente del sol se divide principalmente en 3 bandas, en función de la longitud de onda [19]. En primer lugar, se encuentra la radiación UVC, cuya longitud de onda abarca 100-280 nm. Sin embargo, la totalidad de la radiación es absorbida por el ozono localizado en la estratosfera y sólo es relevante en las zonas en las que dicha capa está disminuida como en las zonas polares. A continuación, con una mayor longitud de onda se encuentra la radiación UVB, que abarca el rango de 280-320 nm. Esta radiación atraviesa nuestra atmósfera, siendo una de las radiaciones solares nocivas perjudiciales para la salud. En último lugar, se encuentra la radiación UVA, que presenta la mayor longitud de onda, comprende el rango 320-400 nm. Esta radiación también penetra en la atmósfera y es perjudicial para la salud [17].

La melanina presenta una función importante en nuestro organismo contra las radiaciones UV de tipo A y B, presentando diferencias en la forma de actuar frente a un tipo u otro. La radiación

UVB es de mayor energía que la A y es en porcentaje la radiación minoritaria en el espectro UV que atraviesa la atmósfera. La radiación UVB es la principal responsable del daño directo por radiación del ADN, mediante la formación de dímeros o fotoproductos [20]. Además, es la principal contribuyente a la producción de eritemas en la piel, ya que la efectividad decrece conforme la longitud de onda es mayor. Sin embargo, a pesar de estos aspectos perjudiciales, la radiación UV-B, es la responsable de la producción de melanina, aumentando la cantidad de gránulos y su dispersión en el citoplasma, contribuyendo a una mayor protección frente a las radiaciones [20, 21]. El UVB incide sobre las capas superficiales de la epidermis, siendo bloqueada por los queratinocitos que poseen melanina. Esta interferencia se produce debido a que la melanina contenida en los queratinocitos absorbe dicha radiación y desarrolla un fenómeno de *scattering* mediante el cual impide la incidencia en capas más profundas [22]. Otro de los aspectos positivos de la radiación ultravioleta B es la propiedad de inducir la síntesis de vitamina D, mediante la absorción de esta radiación por el 7-deshidrocolesterol presente en la dermis y la epidermis, que se transforma en la provitamina D₃ [23].

La radiación UVA posee una longitud de onda mayor y por tanto es menos energética que la B. Sin embargo, es mucho más penetrante, llegando a incidir incluso en el tejido subcutáneo [24]. Esta radiación es también responsable del daño en el material genético, pero en este caso, el daño se debe a la formación de especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*), que contribuyen también al envejecimiento de la piel. Este tipo de UV no es dispersado por la melanina y comprende la mayor parte de la radiación que atraviesa la atmósfera. Con respecto a sus propiedades, la radiación UVA no induce melanogénesis a pesar de su capacidad de incrementar la pigmentación de la piel. Esto es debido a que esta radiación sólo produce una fotooxidación de la melanina ya existente, dando lugar a un color grisáceo que desaparece en un corto rango de tiempo, desde minutos a horas. Además, este tipo de bronceado no posee capacidad fotoprotectora [21].

1.4.-Estrés oxidativo y envejecimiento

El envejecimiento es un proceso natural y propio de los organismos vivos, siendo el envejecimiento de la piel la primera señal del paso del tiempo, sin embargo, existen distintos tipos de envejecimiento. En primer lugar, se puede distinguir el envejecimiento intrínseco, que es inevitable, y tiene causas tales como los factores genéticos, el metabolismo y el paso del tiempo, produciendo defectos en los sistemas de reparación [25]. El metabolismo oxidativo es el responsable de gran parte las especies reactivas de oxígeno, cuyo principal contribuidor es la

mitocondria, seguido de los peroxisomas y el retículo endoplasmático. Estos radicales poseen una descompensación en la carga electrónica y, por lo tanto, esto los hace reaccionar con diferentes moléculas que conforman las estructuras, provocando daños en el ADN, membrana o citoesqueleto dando lugar al envejecimiento intrínseco, que además está relacionado con la pérdida de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas [24].

El fotoenvejecimiento es un envejecimiento extrínseco provocado por la radiación solar se produce o por la formación de especies reactivas de oxígeno debido a eventos adversos del exterior como pueden ser la polución o el tabaco. Se estima que el 80-90% del desarrollo del envejecimiento de la piel se debe al estrés oxidativo [26].

Con respecto al fotoenvejecimiento, hay 2 formas en las que la radiación UV afecta, ya que como se ha comentado anteriormente tan solo llegan a la superficie terrestre el UVA y B. La radiación UVB no atraviesa la epidermis y por tanto incide sobre ella. Al ser una radiación energética produce tanto un daño directo a los ácidos nucleicos como una inflamación que induce la producción de interleucinas y la presencia de células del sistema inmune, dando lugar a la producción de ROS en respuesta a la agresión externa. En estas circunstancias la melanina actúa como cromóforo, absorbiendo la radiación, impidiendo el desarrollo de la reacción inflamatoria y por tanto evitando la inflamación en la que se producen ROS [24, 27].

La radiación UVA posee una longitud de onda mayor, pero por el contrario una menor energía. Incide sobre las capas más profundas de la piel, siendo absorbida por moléculas como el ácido urónico, riboflavinas, melanina, bilirrubina, grupo hemo y porfirinas, lo cual produce la excitación de estas moléculas. Esta absorción de energía cedida por la radiación desemboca en dos reacciones, una puede ser la vuelta al estado basal mediante la emisión de la energía en forma de calor o fluorescencia. Si esta reacción no sucede, entonces la molécula promociona a un estado de triplete excitado, de forma que puede reaccionar con ADN u oxígeno, dando lugar a modificaciones en el ADN o la producción de ROS.

Además, se ha constatado que las radiaciones, tanto UVB como UVA, poseen la capacidad de activar unas enzimas conocidas como metaloproteinasas de la matriz, cuya función es la degradación de la matriz extracelular, las cuales adquieren protagonismo en el envejecimiento [28]. La degradación de la matriz extracelular conlleva la pérdida de firmeza, elasticidad y aparición de arrugas y otros efectos visibles.

2.-Antecedentes

Las plantas medicinales comenzaron a usarse hace cinco mil años por primera vez en las regiones sumerias. Desde entonces, han sido las protagonistas de una búsqueda en la naturaleza como remedio de las distintas enfermedades que afectaban a los distintos imperios, hoy conocidos como compuestos bioactivos [29].

Los antioxidantes son moléculas estables de bajo peso molecular. Son capaces de donar un electrón a moléculas de radicales libres y de esta forma neutralizarlas, evitando de esta forma que puedan dañar a otras moléculas, lo cual contribuye al envejecimiento prematuro celular [30].

Gran parte de los antioxidantes sintetizados por las plantas, pertenecen al grupo de los polifenoles. Se trata de moléculas derivadas del metabolismo secundario de las plantas [31], que son metabolitos necesarios para su supervivencia. Su síntesis se debe principalmente a la capacidad que poseen las plantas para producir compuestos fitoquímicos como defensa ante los patógenos o animales herbívoros u otras condiciones de estrés como la falta de agua y la radiación solar.

Nuestro organismo posee mecanismo de defensa contra el envejecimiento, uno de ellos es la presencia familias de enzimas especializadas en la neutralización de las ROS, responsables del envejecimiento debido a su capacidad de reaccionar con moléculas estables. Una de ellas es la familia superóxido dismutasa (SOD), de la cual el ser humano posee 3 isoformas (SOD1, SOD2 y SOD3). Estas enzimas se encargan de la dismutación del anión superóxido O_2^- en O_2 y H_2O_2 , mediante reacciones redox en los que se encuentra involucrado su centro activo constituido por metales como el cobre o el manganeso [32]. Sin embargo, en ocasiones se rompe el equilibrio entre la producción de ROS y antioxidantes (**Figura 4**), como sucede cuando el cuerpo se encuentra bajo situaciones de estrés. En estos casos, es necesario complementar la cantidad de antioxidantes en la dieta [33], bien sea mediante un mayor consumo de frutas y verduras, mediante el consumo de alimentos enriquecidos en antioxidantes o con la ingesta de preparados de extractos vegetales (nutracéuticos). Existen una gran variedad de plantas que poseen propiedades antioxidantes como puede ser la especie *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) [34] o *Hibiscus sadariffa* (Hibisco) [35].

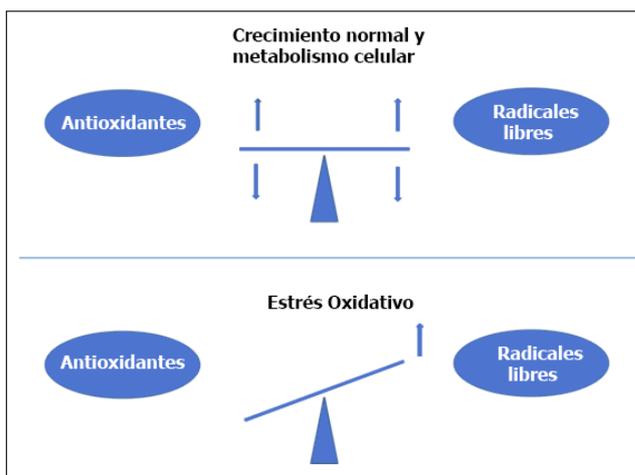


Figura 4: Representación del equilibrio oxidativo. En él que intervienen la presencia tanto de los radicales libres como de los antioxidantes. El aumento de los radicales libres produce el estrés oxidativo que influye en el envejecimiento.

Con respecto a la capacidad inductora o inhibidora de la melanogénesis, se conocen algunas plantas que presentan dichas propiedades. Estas capacidades se atribuyen principalmente a que sintetizan ciertos compuestos que interactúan en la ruta de biosíntesis de la melanina [36], activando o inhibiendo enzimas que participan en la producción o degradación de la melanina.

Un ejemplo de extractos con capacidad de inducir la melanogénesis es el extracto de *Melissa officinalis*. La melisa es una planta típica mediterránea usada cotidianamente en infusiones. Se ha constatado que dicho extracto protege de los daños producidos por la radiación UVB, además de poseer capacidad antioxidante e inducción de melanogénesis [37].

Por otro lado, el extracto de *Sophora angustifolia* produce la inhibición de la melanogénesis. *Sophora angustifolia* es una planta presente en los continentes asiático y americano, se suele utilizar en ornamentación. Este extracto es un inhibidor de la tirosinasa, que es una enzima que cataliza la producción de melanina. La inhibición de esta enzima por el extracto evita que se produzca melanina y su transferencia desde los melanocitos a los queratinocitos [38].

3.-Objetivos

Se dispone de 5 extractos obtenidos de plantas mediterráneas y tropicales.

Teniendo conocimiento del potencial terapéutico que poseen las plantas, en relación con tratamientos relacionados con el ámbito de la piel y la protección solar, se decide testar las propiedades planteadas en los siguientes objetivos generales:

- 1.-Conocer la actividad antioxidante
- 2.-Determinar su acción sobre un modelo de melanogénesis.
- 3.-Estudiar su capacidad fotoprotectora.

Dichos objetivos se desarrollarán a través de los siguientes objetivos secundarios:

1. Análisis del contenido fenólico y la actividad antioxidante mediante los ensayos Folin, TEAC, FRAP y ORAC.
2. Puesta a punto de un ensayo para el estudio de la melanogénesis en un modelo de melanocitos de ratón.
3. Estudio de la capacidad fotoprotectora en un modelo de queratinocitos humanos.

4.-Materiales y métodos

4.1.- Extractos vegetales

En el presente trabajo se utilizaron 5 extractos vegetales para estudiar su contenido fenólico, capacidad antioxidante, y su posible inducción o inhibición de la melanogénesis y efecto fotoprotector. Estos extractos fueron aportados por el grupo de investigación del doctor Antonio Segura de la Universidad de Granada.

Estos extractos tienen la siguiente codificación: ES2; ES4; ES6; PAA65 y PAA85. Se realizaron stocks de 5 mg/mL para la realización de los ensayos bioquímicos a partir del extracto seco. En el caso de ES2, ES4 y ES6, el disolvente fue metanol-agua (MeOH-H₂O) en una proporción de 50:50 y en el caso de PAA65 y PAA85 fue etanol-agua (EtOH-H₂O) en una proporción de 50:50.

Para los ensayos en cultivo celular, en lugar de usar esos disolventes se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver el extracto a una concentración de 30 mg/mL a partir del extracto seco.

4.2.-Ensayos bioquímicos

El ensayo de Folin-Ciocalteu determina la cantidad de fenoles total. El fundamento de este experimento se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el reactivo de Follin-Ciocalteu, dando lugar a un compuesto de color azul detectable mediante su absorbancia [39].

Tras la determinación del contenido fenólico de los extractos, se procedió a la caracterización de su capacidad antioxidante. Para ello se recurrió a diferentes métodos *in vitro*, en concreto a tres:

1. El ensayo TEAC mide la actividad antioxidante de los compuestos debido a su capacidad de reducir moléculas oxidadas, dando lugar a un compuesto coloreado [40]. El patrón usado en este caso es el trólox, que es un análogo de la vitamina E.
2. El FRAP se trata de un ensayo que mide directamente la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra estudiada, debido a que se trata un ensayo colorimétrico, en el que se mide la reducción de un compuesto mediante los antioxidantes presentes en la muestra [41]. El patrón usado es el sulfato de hierro.

3. El ORAC se trata de un ensayo que mide la capacidad antioxidante de las muestras presentes en el estudio por su capacidad de neutralizar las especies reactivas de oxígeno[42]. El patrón usado es el trólox.

La realización de estos ensayos se encuentra explicada en un artículo desarrollado por el grupo de investigación de Compuestos Bioactivos [43].

4.3.-Cultivo celular y mantenimiento

Para el desarrollo de esta línea de investigación se ha usado la línea celular B16-F0, corresponde al modelo de melanoma murino que fue obtenido de la ATCC[44]. Es un modelo ampliamente utilizado en el estudio de melanogénesis [45].

El mantenimiento de la línea se realizó con DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con alto contenido en glucosa (4,5 g/L), piruvato, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/S). Dichos productos fueron suministrados por Gibco (*Life Technologies Corporation*, Europa).

Se mantuvo un control tanto de la morfología como de la confluencia de la línea celular mediante microscopía. Se tripsinizó 2-3 veces por semana, cuando la confluencia se aproximaba al 100%. Para ello, en primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se lavó la superficie con 5 mL de tampón fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS). A continuación, se añadieron 2 mL de tripsina 0,05%, dejándola actuar 2 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda. Tras este tiempo se añadieron 10 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina a una proporción 1:5. Para proceder con el recuento celular se añadieron 10 µL de la disolución en la cámara de Neubauer, estableciendo de esta manera el volumen necesario para la realización de ensayos a la densidad de siembra adecuada. Una vez sembradas, las placas se mantuvieron 48 horas en un incubador hasta su tratamiento.

4.4.-Ensayo de densidad de siembra

Para la realización de los ensayos celulares, en primer lugar, es necesario estandarizar la densidad de siembra óptima para que las confluencias de las células sembradas cumplan los plazos establecidos para su posterior tratamiento y revelado.

Para la determinación del número de células se siguieron unas pautas preestablecidas basadas en la siembra de concentraciones celulares distintas en orden creciente en placas de 96 pocillos.

Se procedió a analizar la confluencia de las distintas condiciones de las placas a 48, 72 y 96 horas tras la siembra. Se analizó la morfología y la confluencia celular diariamente. La concentración celular seleccionada fue de 6.000 células/pocillo, debido a que la confluencia alcanzada a las 48 horas es del 76%, a las 96 horas del 100% y las células conservaban una morfología adecuada. La segunda razón por la que se determinó esta densidad de siembra celular óptima es porque, cuando la línea celular crece hasta una confluencia del 100%, se produce la síntesis y expulsión de la melanina al medio extracelular.

4.5.- Ensayos de melanogénesis

Se estudió la capacidad de los extractos de inducir o inhibir el proceso de melanogénesis en la línea celular de melanoma B16 en comparación con dos agentes químicos que producen su inhibición (ácido kójico) e inducción (3-isobutil-1-metilxantina o IBMX). Además, se estudió el efecto de los compuestos sobre la melanogénesis bajo una irradiación previa con UV, ya que la radiación UV posee un potencial inductor de la melanogénesis.

Para poder observar las capacidades que poseen los extractos vegetales, en primer lugar, se puso a punto el tiempo del tratamiento y la concentración de los controles ácido kójico e IBMX. Posteriormente se realizó el estudio del efecto de los extractos sobre la melanogénesis en comparación con los controles.

En segundo lugar, se estudió el efecto de la irradiación UVB y A sobre los melanocitos y se eligió la dosis de irradiación para determinar si hay una interacción entre los extractos y la irradiación UV.

4.5.1.-Determinación del tiempo de tratamiento y concentración de los controles químicos

Los controles ácido kójico e IBMX fueron testados para elegir la concentración a la cual ejercen el efecto deseado y no haya toxicidad.

En la realización del ensayo se escogieron distintos tiempos para analizar la evolución de la melanina y viabilidad, tanto el tiempo post-siembra antes del tratamiento como post-tratamiento con los controles. Tras los resultados obtenidos en función de la melanina sintetizada y la viabilidad adquirida de la línea celular en los distintos tiempos probados, se escogió un tiempo de 48 horas de post-siembra y posteriormente otras 48 horas de tratamiento.

En base a los resultados obtenidos para el tiempo de post-siembra y tratamiento elegido se escogieron las concentraciones de ácido kójico e IBMX.

El ácido kójico se utilizó como control de la inhibición de la melanogénesis. Este compuesto se relaciona con la inhibición de la producción de melanina debido a que impide la realización de ciertas actividades propias de la tirosinasa mediante inhibición competitiva.

El IBMX se utilizó como control de inducción de melanogénesis. Se trata de un compuesto metilado derivado de la xantina (molécula perteneciente a las purinas). Este compuesto induce la producción de melanina mediante la interacción con las proteínas MITF (*melanogenesis associated transcription factor*), pues son responsables de la transcripción de las enzimas involucradas en la melanogénesis.

Se probó el rango de concentración del ácido kójico de 70 a 3500 μM y del IBMX de 25 a 100 μM . Para la elección de la concentración de los controles a usar en los siguientes ensayos se midió la evolución de la melanina y la viabilidad a tiempo final.

La melanina se midió a 475 nm. Para esta medición se usó el lector de placas *SPECTROstar Omega*. Este equipo mide de forma automatizada la absorbancia de las placas.

La viabilidad se determinó mediante el ensayo Hoechst. Este método de determinación de la viabilidad celular se basa en el uso de la sonda fluorescente Hoechst, que presenta afinidad por la cromatina. El revelado de la viabilidad se realizó mediante un microscopio de fluorescencia, *Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader*. Se trata de un microscopio de fluorescencia que combina la microscopía digital de campo ancho automatizada junto con la lectura de placas, mediante el cual se puede visualizar con imágenes la fluorescencia emitida por la sonda HOESCHST. De esta manera se puede observar y cuantificar la viabilidad de las células por dos métodos, el conteo de núcleos que lleva a cabo el equipo o la medición de la intensidad de fluorescencia que recoge de cada pocillo.

4.5.2.-Efecto de los extractos en la melanogénesis

En la constatación de la capacidad inductora o inhibidora de nuestros extractos vegetales, se llevaron a cabo ensayos de tratamiento con los extractos vegetales de la línea celular de melanocitos, B16.

Las células se trataron transcurridas 48h después de la siembra. Se usó un extracto vegetal por placa, a diferentes concentraciones (10, 25, 50, 75, 100 y, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con sus correspondientes

controles, el ácido kójico, el IBMX y el control de disolvente DMSO. El tratamiento fue de 48 horas. Transcurrido ese tiempo se determinó la melanina midiendo la absorbancia a 475 nm y la viabilidad mediante el ensayo Hoechst.

4.5.3.-Determinación de la dosis de los controles UV

En la realización de este ensayo se usaron placas de 96 pocillos previamente sembradas con las células B16. Transcurridas 48 horas tras la siembra se procedió a irradiar las placas con distintas dosis de UVB y A.

Para la exposición de las células a la irradiación con UVA se usó el crosslinker *Bio-Link* de UVA. Se usó un rango de dosis de irradiación de 1 a 16 J/cm².

Para las placas que fueron irradiadas con UVB se utilizó el *crosslinker* de UVB. Se usó un rango de dosis de UVB de 300 a 1000 J/m².

Se midió la melanina a 475 nm y la viabilidad mediante el ensayo cristal violeta de las distintas placas. El cristal violeta es un agente de tinción usado en la determinación de la viabilidad de cultivos celulares. Este método está basado en la afinidad de dicho compuesto por la superficie externa del material genético (ADN), al cual se adhieren [46]. La cantidad de agente de tinción unido a la doble hélice es directamente proporcional a la cantidad de la misma, siendo la absorbancia analizada directamente proporcional al número de células viables.

En base a los resultados obtenidos se eligió la dosis de UV óptima para el estudio posterior de la interacción de los extractos con la irradiación UV.

4.5.4.- Determinación del efecto extracto-UVB

Tras haberse determinado la dosis óptima de irradiación con UVB se procedió a la realización del ensayo para la determinación de las posibles interacciones entre los extractos vegetales y la radiación UV sobre la melanogénesis.

Para llevar a cabo este experimento, se usaron distintas concentraciones para cada extracto: para ES2 se usaron las concentraciones de 75 y 125 µg/mL, el extracto ES4 se probó a 25 y 75 µg/mL, el ES6 a 10 y 50 µg/mL, el PAA65 a 100 y 125 µg/mL y, por último, el PAA85 se usó a las concentraciones de 100 y 125 µg/mL. Estas concentraciones fueron elegidas en base a los resultados previos del efecto de los extractos sobre la melanina y viabilidad.

Para la determinación del efecto de los extractos con la irradiación UVB, se midió la melanina producida en condiciones de presencia de irradiación y en ausencia de la misma con los tratamientos de los extractos elegidos y los controles. Además, se midió la viabilidad celular con el ensayo de cristal violeta.

4.6.-Ensayo de fotoprotección

Se llevó a cabo la determinación de la capacidad fotoprotectora de los extractos vegetales. Este ensayo consistió en la irradiación con UVB de una línea celular de queratinocitos en presencia o ausencia de los extractos y la posterior medición del estrés oxidativo para determinar si los extractos protegen frente a la irradiación en esas condiciones. Esta disminución del estrés oxidativo generado por la irradiación con UVB podría relacionarse con un efecto fotoprotector.

Este ensayo se basa en la utilización de la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA o DCF-DA), se trata de una sonda permeable a la membrana celular, por lo que puede atravesarla y alojarse en el interior celular [47]. Una vez la sonda ha permeado sufre una desesterificación, este proceso le confiere la propiedad de emitir fluorescencia si es oxidada por ROS[47]. De esta manera una mayor fluorescencia se relaciona con una mayor concentración de ROS y por lo tanto de estrés oxidativo. La línea celular usada en este ensayo de fotoprotección fue la línea HaCat, correspondiente a queratinocitos. La densidad de siembra fue de 14.000 células por pocillo. 24 horas después de la siembra se irradiaron las placas en presencia de los distintos tratamientos. Se utilizó un control sin extracto y las concentraciones de 100 y 200 µg/mL para cada extracto. Después de la irradiación se incubó con la sonda DCF-DA y se midió la fluorescencia en el microscopio de fluorescencia *Cytation 3*. Además se determinó la viabilidad con Hoechst.

4.7.-Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa informático *Graphpad Prism 6*. Los valores se expresaron con la media y la desviación estándar (DE), en función del ensayo realizado. Se realizó el análisis de la varianza (*One-way analysis of variance ANOVA*) y se estableció si existían diferencias significativas mediante el test de Tukey.

5.-Resultados

5.1.-Contenido fenólico y actividad antioxidante de los extractos

Como se ha comentado anteriormente, se ha determinado el contenido fenólico y posteriormente la capacidad antioxidante de los extractos vegetales.

La determinación del contenido fenólico de los extractos fue realizada mediante el ensayo Folin, que determina el contenido fenólico en equivalentes de ácido gálico (GAE).

Una vez se determinó el contenido fenólico en los extractos, se estudió la actividad antioxidante de los mismos. Para ello se recurrió a tres ensayos. El TEAC expresa la capacidad antioxidante en equivalentes de trólox. El FRAP muestra la capacidad antioxidante en equivalentes de sulfato férrico. Por último, el ORAC muestra la capacidad antioxidante en equivalentes de trólox.

A continuación, se presentan los resultados del contenido fenólico y actividad antioxidante que se han obtenido mediante los ensayos bioquímicos comentados anteriormente (**Tabla 1**):

Extractos	Folin		TEAC		FRAP		ORAC	
	% GAE	DE	mmol Trolox Eq/100g	DE	mmol de FeSO ₄ Eq/100g	DE	mmol Trolox Eq/100g	DE
ES2	24,20	1,62	307,17	16,19	291,66	10,83	64,00	5,62
ES4	24,30	4,43	295,41	28,86	256,01	10,18	65,95	0,51
ES6	50,03	1,18	573,42	37,90	526,54	13,47	55,37	3,02
PAA65	21,12	1,00	68,59	7,48	103,70	5,34	109,26	2,10
PAA85	26,35	4,61	113,04	17,29	243,65	26,97	96,15	0,77

Tabla 1: Resultados bioquímicos correspondientes a la medición del contenido fenólico y potencial antioxidante. DE (Desviación estándar) indica la dispersión de los datos con respecto a la media (n=3). Los resultados antioxidantes son expresados en función del patrón usado.

En los resultados se observa que todos los extractos han mostrado que poseen compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Cabe remarcar tanto el contenido fenólico como la capacidad antioxidante del extracto ES6 que destaca sobre los demás extractos.

5.2.-Confluencia celular óptima

Se determinó la confluencia óptima para la línea celular B16 para la realización de los ensayos de melanogénesis. La confluencia óptima es aquella en la que las células han adquirido tanto la morfología como la capacidad de síntesis de melanina adecuadas. Para ello, se utilizaron distintas densidades de siembra en una placa de 96 pocillos, de 2.000 a 12.000 células por pocillo y se evaluó diariamente la confluencia celular a partir del segundo día tras la siembra (**Figura 5**).

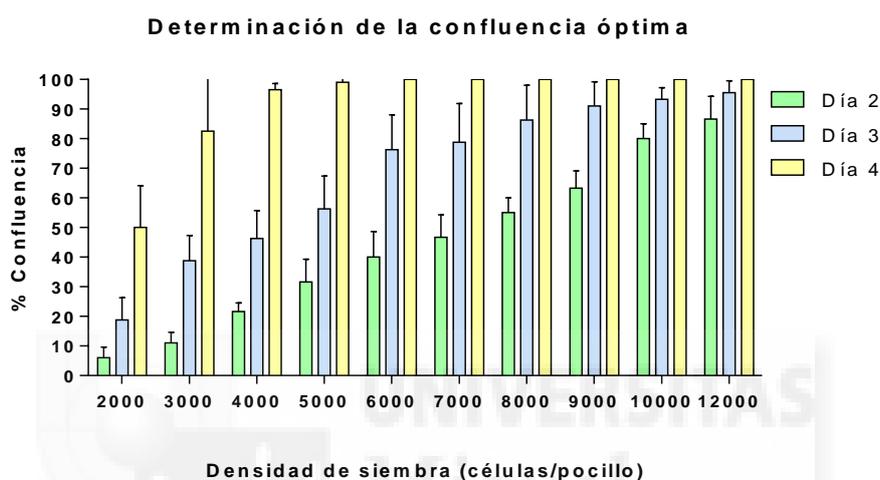


Figura 5: Evolución de la confluencia celular con respecto al tiempo, en el establecimiento de la densidad de siembra óptima, desde el día 2 al 4 y a distintas densidades de siembra, de 2.000-12.000 células/pocillo en la línea celular B16. Los resultados son expresados como la media del porcentaje de confluencia (n=6) \pm DE (Desviación Estándar).

Los resultados mostraron, en función de la densidad de siembra inicial, las confluencias de la línea celular a dos, tres y cuatro días tras la siembra. Como factores determinantes para la selección de la confluencia óptima se postularon tres. En primer lugar, la presencia de una confluencia superior al 60% tras 72 horas o día 3, pero sin alcanzar el 100%. En segundo lugar, la adquisición de una morfología adecuada, evaluada visualmente. Y, en tercer lugar, la presencia de una confluencia total a las 96 horas o día 4. Atendiendo a estos criterios se determinó usar una densidad de siembra de 6.000 células/pocillo.

5.3.-Elección tiempo de tratamiento y concentración controles químicos

Se determinó el tiempo post-siembra y el tiempo de tratamiento, así como la concentración óptima de los controles de inhibición (ácido kójico) e inducción (IBMX) de la melanogénesis en la línea celular B16. La función de dichos controles radica en la comparación con la actividad de los extractos vegetales en la inducción-inhibición de la síntesis de melanina. Los resultados mostraron que el tiempo óptimo previo al tratamiento es de 48 horas y el tiempo de tratamiento de 48 horas. Se muestra la evolución de la melanina a partir del tratamiento con los controles únicamente para los tiempos de incubación elegidos (**Figura 6**).

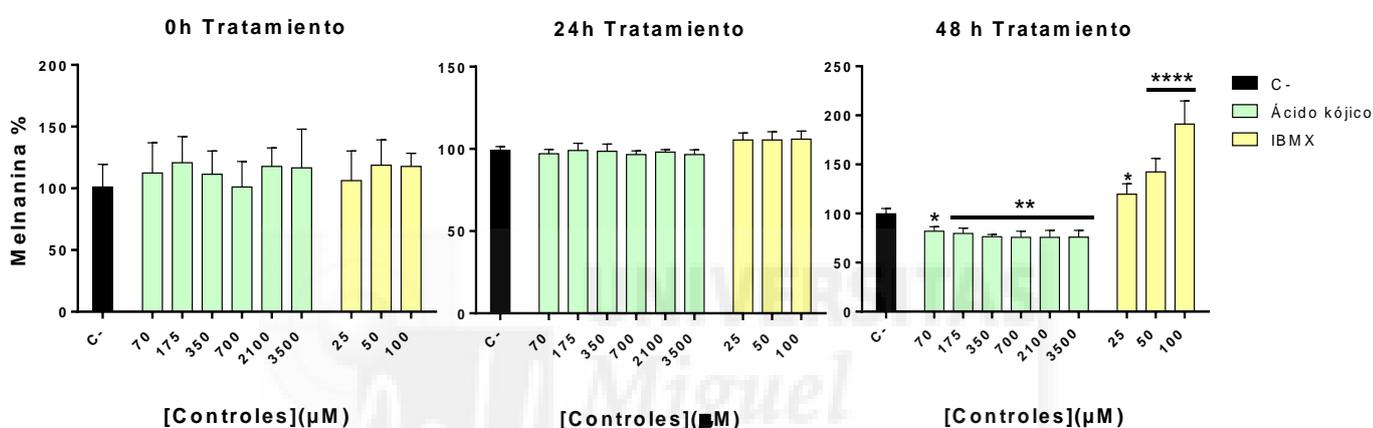


Figura 6: Evolución síntesis de melanina, con respecto al tiempo, tras el tratamiento con los controles para la determinación de la concentración óptima para alcanzar un porcentaje de melanina adecuado. Los datos están expresados como la media ± DE (n= 6) determinada en porcentaje de melanina en función del control y el tiempo. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) y **** ($p<0,0001$) indican las diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento, C-.

Los resultados de la melanina sintetizada en función del control utilizado mostraron el efecto esperado a las 48 horas después del tratamiento. El IBMX produjo un aumento de melanina a las tres concentraciones utilizadas, 25, 50 y 100 µM. Además, el ácido kójico manifestó su efecto inhibitorio en el rango utilizado, de 70 a 3500 µM. Las concentraciones elegidas para los posteriores ensayos fueron: 350 µM de ácido kójico y 100 µM de IBMX. Esta elección se debe a que son las concentraciones a las cuales se produce el efecto de inhibición /inducción máxima sin presentar toxicidad. Además, se determinó la viabilidad a las 48 horas tras el tratamiento con el ensayo de Hoechst (**Figura 7**).

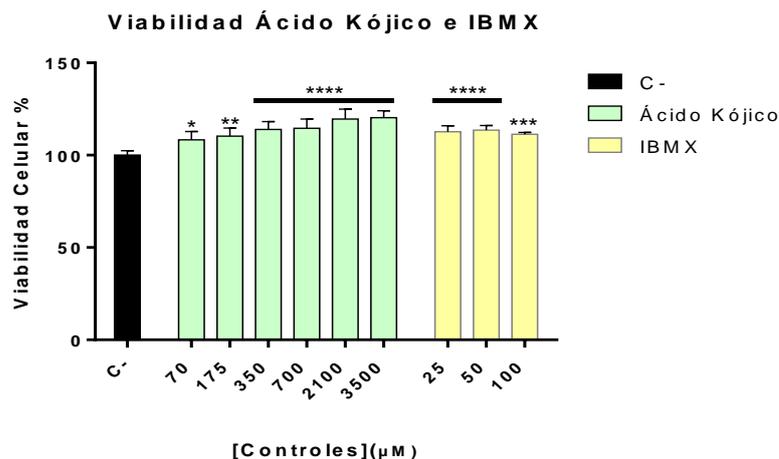
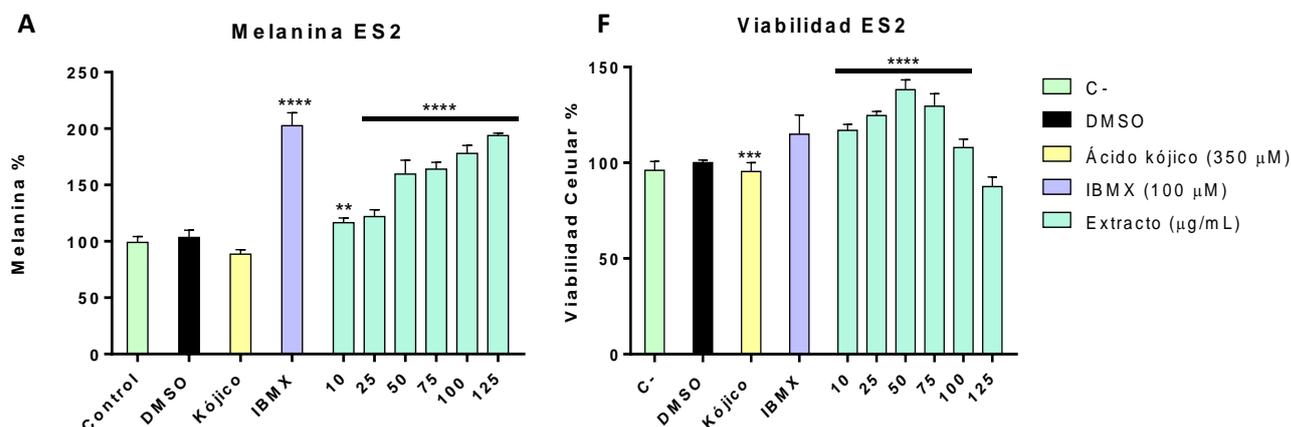


Figura 7: Determinación de la concentración óptima de los controles de inhibición (Ácido kójico) e inducción (IBMX), en el análisis de la viabilidad a distintas concentraciones, teniendo como referencia el control sin tratar (C-), a las 48 horas de tratamiento. Los datos están expresados como la media \pm DE (n= 6) determinada en porcentaje de melanina en función del control. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$) indican las diferencias significativas con respecto al control C-.

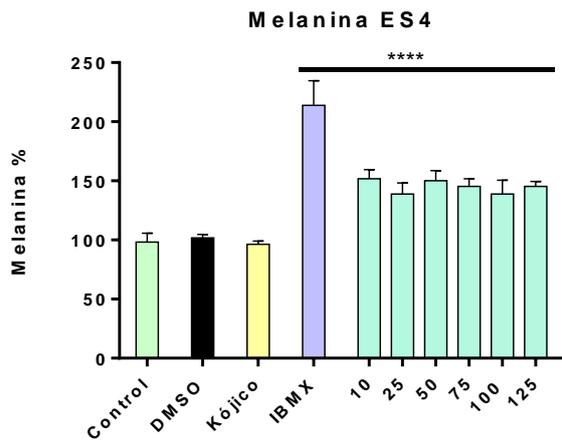
Los resultados obtenidos mostraron una ausencia de toxicidad tanto del ácido kójico como del IBMX a las concentraciones utilizadas. Como control para la normalización de los resultados se dispuso de células sin ningún tipo de tratamiento (C-).

5.4.-Efecto de los 5 extractos en la melanogénesis

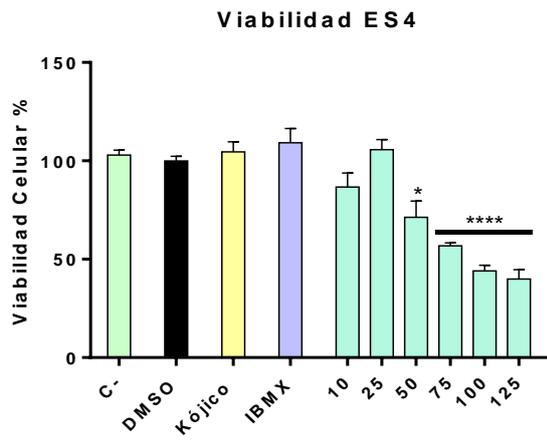
Se determinó el efecto de los extractos sobre la melanogénesis tras 48 horas de tratamiento. Se utilizaron distintos controles: un control sin tratamiento (C-), un control del disolvente a la máxima concentración utilizada (DMSO), un control de IBMX y un control de ácido kójico. Se utilizó una concentración de 100 μM de IBMX y 350 μM de ácido kójico. Las concentraciones finales de los extractos se encuentran en un rango de 10-125 $\mu\text{g/mL}$. Además, se determinó la viabilidad mediante Hoechst (**Figura 8**).



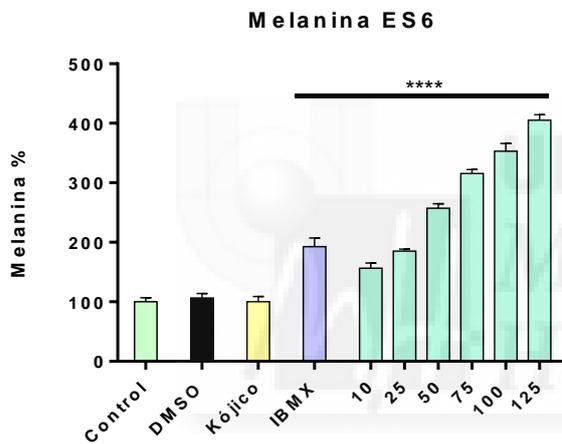
B



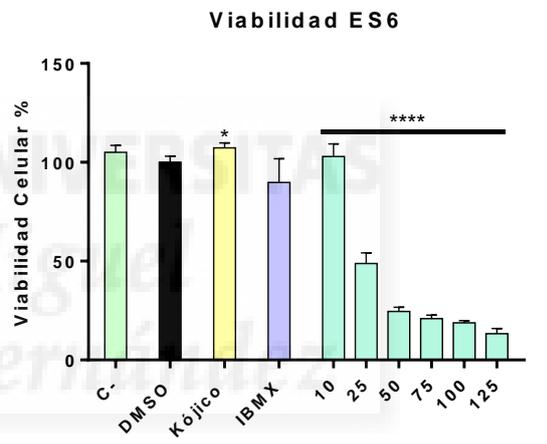
G



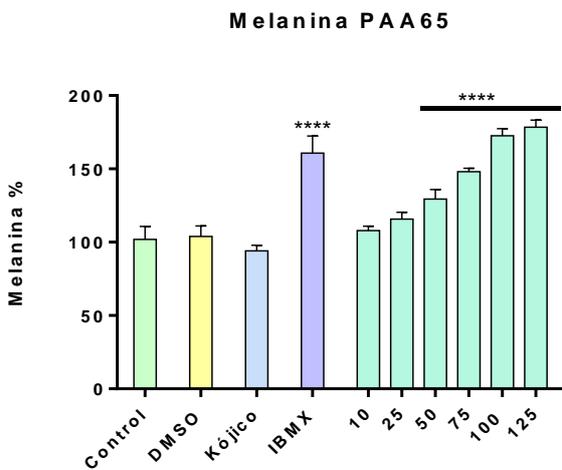
C



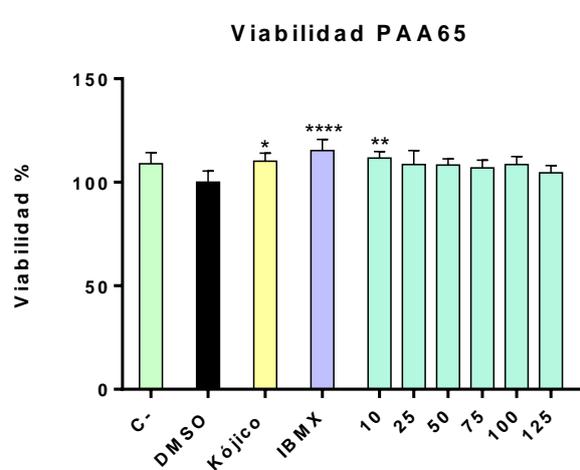
H



D



I



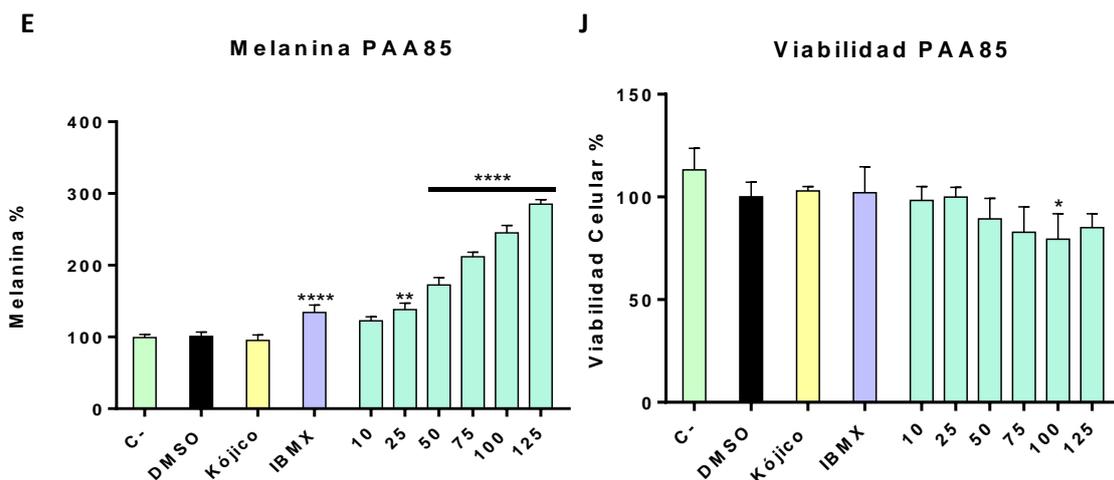


Figura 8: Efecto de los 5 extractos a distintas concentraciones (10-125 µg/mL) en la inducción de la melanogénesis y viabilidad. **A-E** representan el porcentaje de melanina obtenido con el tratamiento con los extractos ES2, ES4, ES6, PAA65 y PAA85 respectivamente y **F-J** representa la viabilidad en el mismo orden. Los datos están expresados como la media ± DE (n= 6) determinada en porcentaje de melanina o viabilidad en función del extracto. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$) indican las diferencias significativas con respecto al control de DMSO.

Los resultados muestran el porcentaje de melanina en función del control DMSO. Hay un aumento de la melanina dosis-dependiente para los extractos ES2, ES6, PAA65 y PAA85. Sin embargo, el extracto ES4 no muestra dicha respuesta dosis-efecto, pues posee el mismo porcentaje de melanina a la mínima y a la máxima concentración del extracto.

En cuanto a la viabilidad obtenida, se puede observar que el extracto ES4 muestra toxicidad a las concentraciones más altas, el extracto PAA85 presenta una tendencia a tener toxicidad a concentraciones elevadas y el extracto ES6 tiene una marcada toxicidad para todas las concentraciones probadas. Estos resultados se utilizaron para elegir las concentraciones de cada extracto en el ensayo de interacción del tratamiento con la irradiación UVB.

Además, se presenta la relación de la cantidad de melanina producida por melanocito, en función del tratamiento realizado (**Figura 9**). Para ello se divide la melanina entre la viabilidad obtenida en este ensayo. El objetivo es exponer la capacidad de síntesis de los melanocitos con los distintos tratamientos en función de la viabilidad. Sin embargo, dicha relación no es del todo exacta, ya que en los casos en los que hay toxicidad se puede producir una sobreestimación de la producción de melanina.

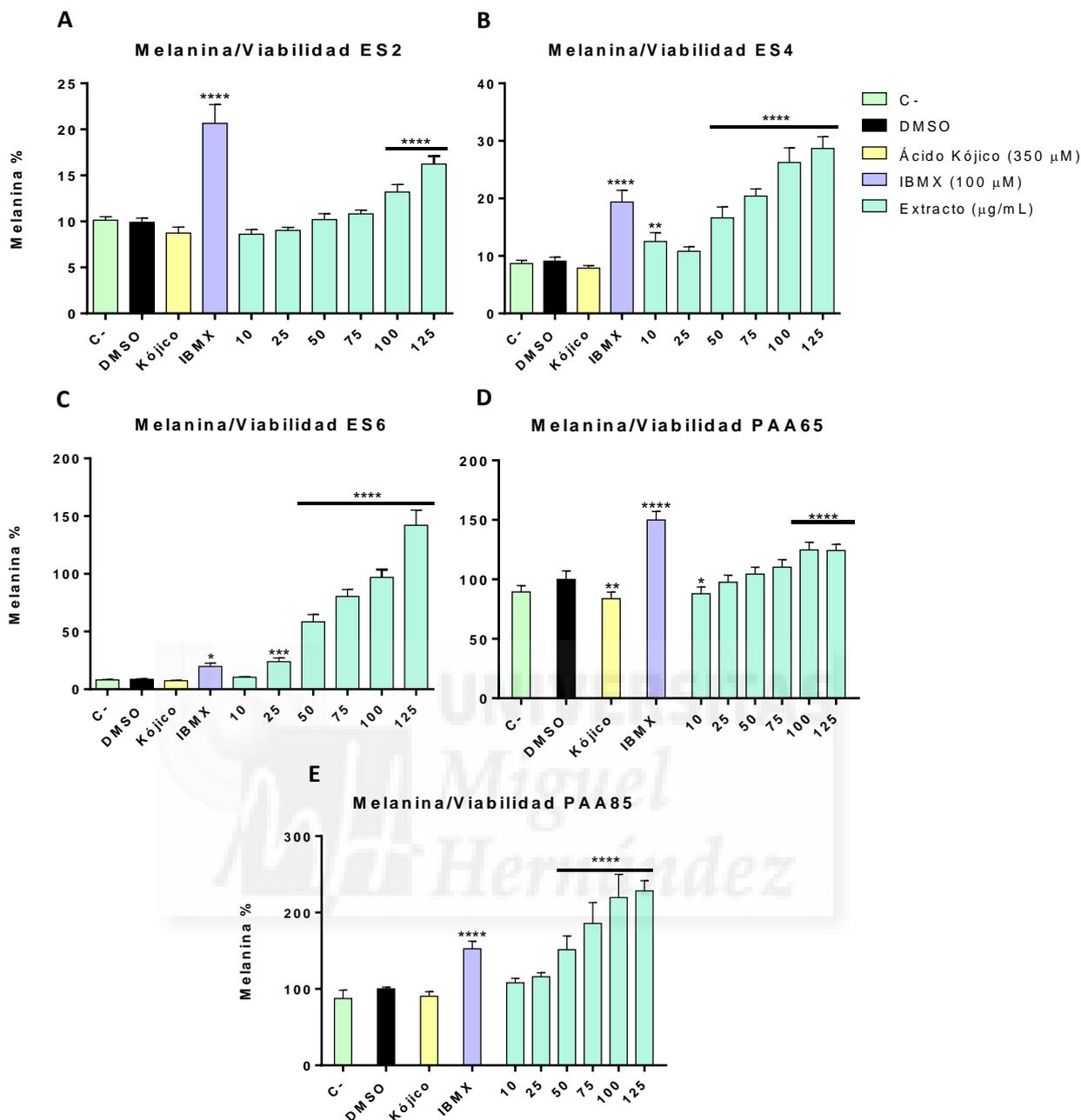


Figura 9: Relación de la melanina con la viabilidad de los diferentes extractos en comparación con el control DMSO. A-E representan el porcentaje de melanina/viabilidad obtenido con el tratamiento con los extractos ES2, ES4, ES6, PAA65 y PAA85 respectivamente. Los datos están expresados como la media ± DE (n= 6) determinada en porcentaje de melanina en función del control. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$) indican las diferencias significativas con respecto al control de DMSO.

En los resultados obtenidos se puede observar una alta producción de melanina en los distintos extractos y vuelve a destacar el extracto ES6, aunque como se ha comentado podría ser una sobreestimación debido a la toxicidad que presenta este extracto.

5.5.-Efecto del UVA y B sobre la melanogénesis y viabilidad

Se procedió a la determinación de la irradiación óptima para la inducción de la melanogénesis producida por la irradiación con UVB y UVA. En esta ocasión ambas radiaciones se postularon como controles de inducción de la síntesis de melanina. Para la determinación de su efecto sobre la melanogénesis se irradiaron por separado placas de 96 pocillos, estableciendo un rango de dosis. Una vez irradiadas se determinó tanto la melanina midiendo la absorbancia a 475 nm como la viabilidad celular con el ensayo de cristal violeta.

La radiación UVB se probó en el rango de dosis de 300 a 1000 J/m². Se determinó la melanina y la viabilidad a las 48 horas después de la irradiación (**Figura 10**).

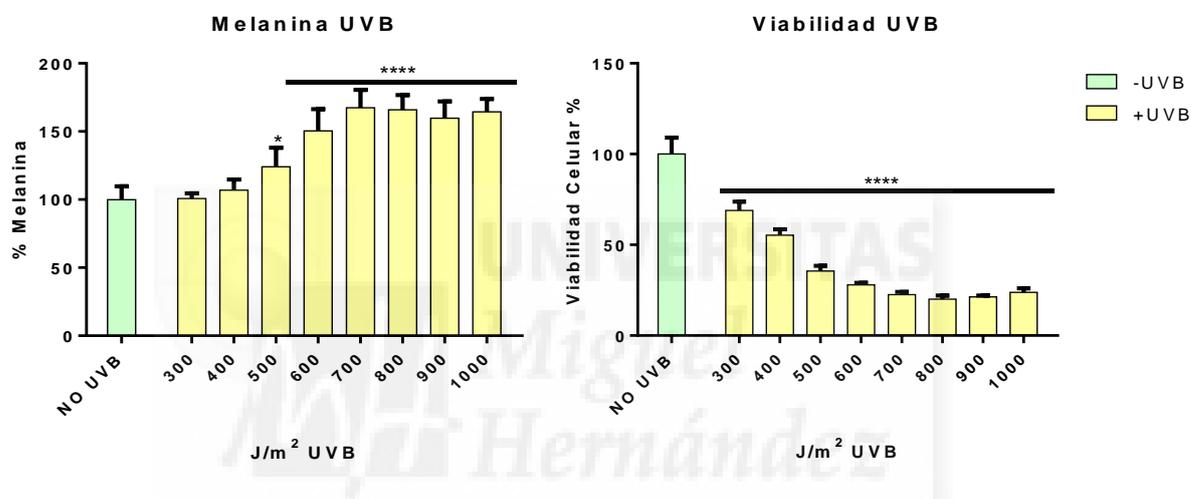


Figura 10: Efecto de la radiación UVB sobre la melanina y la viabilidad de la línea celular B16. Se utilizó un rango de dosis de 300 a 1000 J/m². Los datos están expresados como la media ± DE (n= 6) determinada en porcentaje de melanina o viabilidad en función de la dosis. **** (p<0,0001) indica las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de NO UVB.

Los resultados muestran un aumento significativo de la melanogénesis en el caso de la inducción con UVB a partir de una potencia de 500 J/m². Si se analiza la viabilidad celular se observa que la radiación produce toxicidad a partir de la dosis más baja probada de 300 J/m². De esta manera, la toxicidad se incrementa sustancialmente a partir de la dosis de 500 J/m² ya que disminuye la viabilidad por debajo del 50% y además se pudo observar visualmente un cambio morfológico importante en las células a partir de esta dosis. A la luz de los resultados obtenidos, se elige la potencia de 400 J/m² como la potencia óptima para el estudio de la interacción de los extractos con la radiación UVB porque es la dosis mayor a la cual no se observa un cambio morfológico importante aunque sí haya toxicidad.

En cuanto a la radiación con UVA, el procedimiento experimental para el estudio del efecto sobre la melanina y viabilidad fue similar al usado en la determinación de la dosis del UVB, con la diferencia que en este caso al tratarse de una radiación menos energética el rango de potencia fue mayor, de 1 a 16 J/cm² (Figura 11).

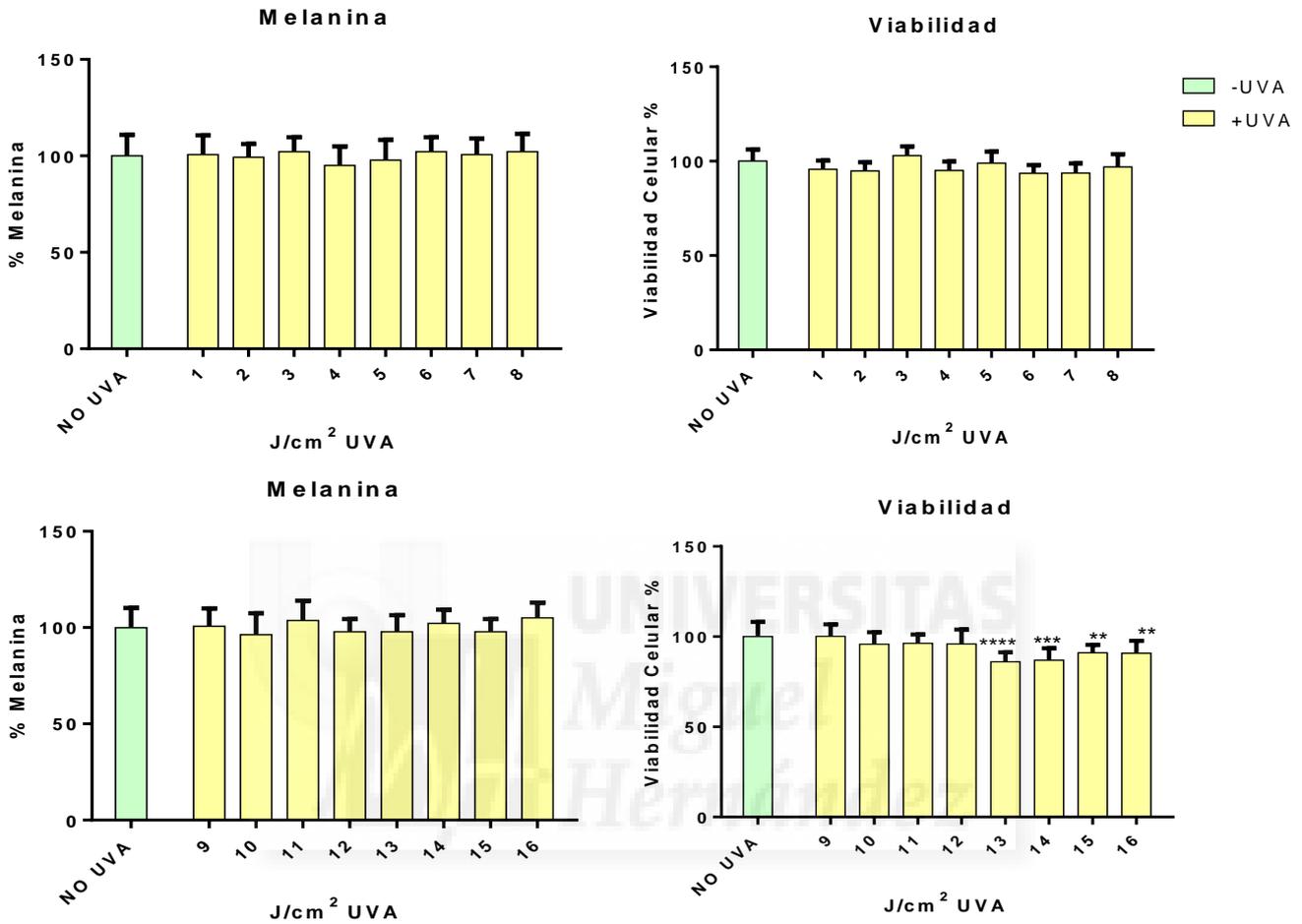


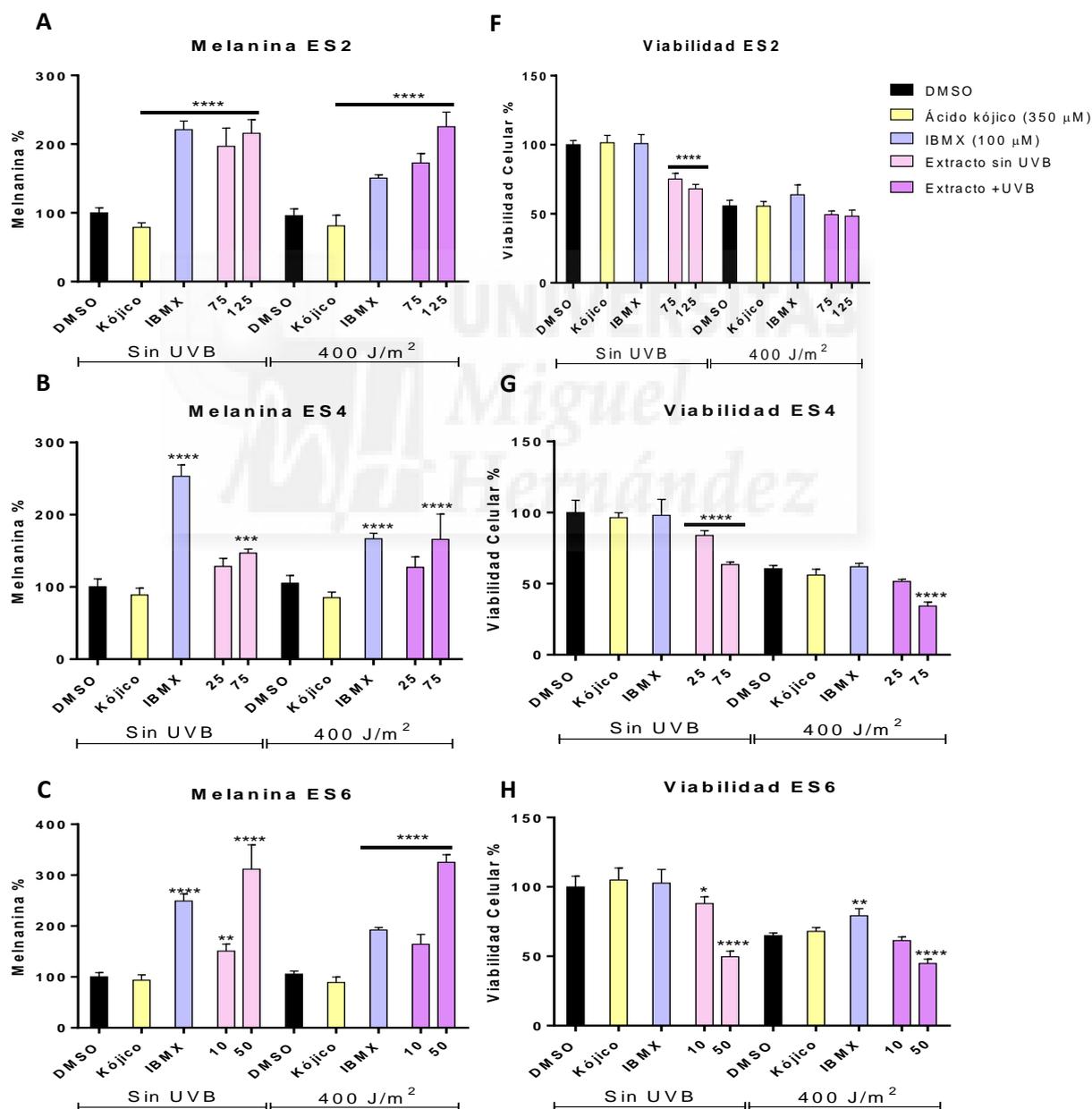
Figura 11: Análisis de la capacidad inductora de la melanogénesis de la radiación UVA y su viabilidad. No se observa efecto sobre la viabilidad y melanina, excepto en las últimas dosis con disminución de la viabilidad. Los datos están expresados como la media ± DE (n= 6) determinada en porcentaje de melanina o viabilidad en función del control y el tiempo. ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$) y **** ($p<0,0001$) indican las diferencias significativas con respecto al control de NO UVA.

El análisis de los resultados de la línea celular irradiada con UVA revela la ausencia de inducción de la síntesis de melanina en todo el rango de dosis utilizado, así como la ausencia de toxicidad salvo en las dosis más altas, a partir de 13 J/cm². Por esta razón se descarta el uso de la radiación UVA como control positivo de inducción de melanogénesis en los ensayos posteriores para su estudio junto a los extractos vegetales.

5.6.-Interacción del UVB con los extractos

El objetivo de este ensayo es determinar si ambos agentes inductores, el tratamiento con extractos y la irradiación con UVB, poseen algún tipo de interacción sobre la inducción de melanogénesis.

En el ensayo presente se trató con los extractos vegetales tras haber irradiado anteriormente la línea celular con radiación UVB a 400 J/m² (**Figura 12**). La irradiación se produce a 48 horas tras la siembra y posteriormente se incubó el tratamiento durante 48 horas. La viabilidad fue determinada con el ensayo de cristal violeta.



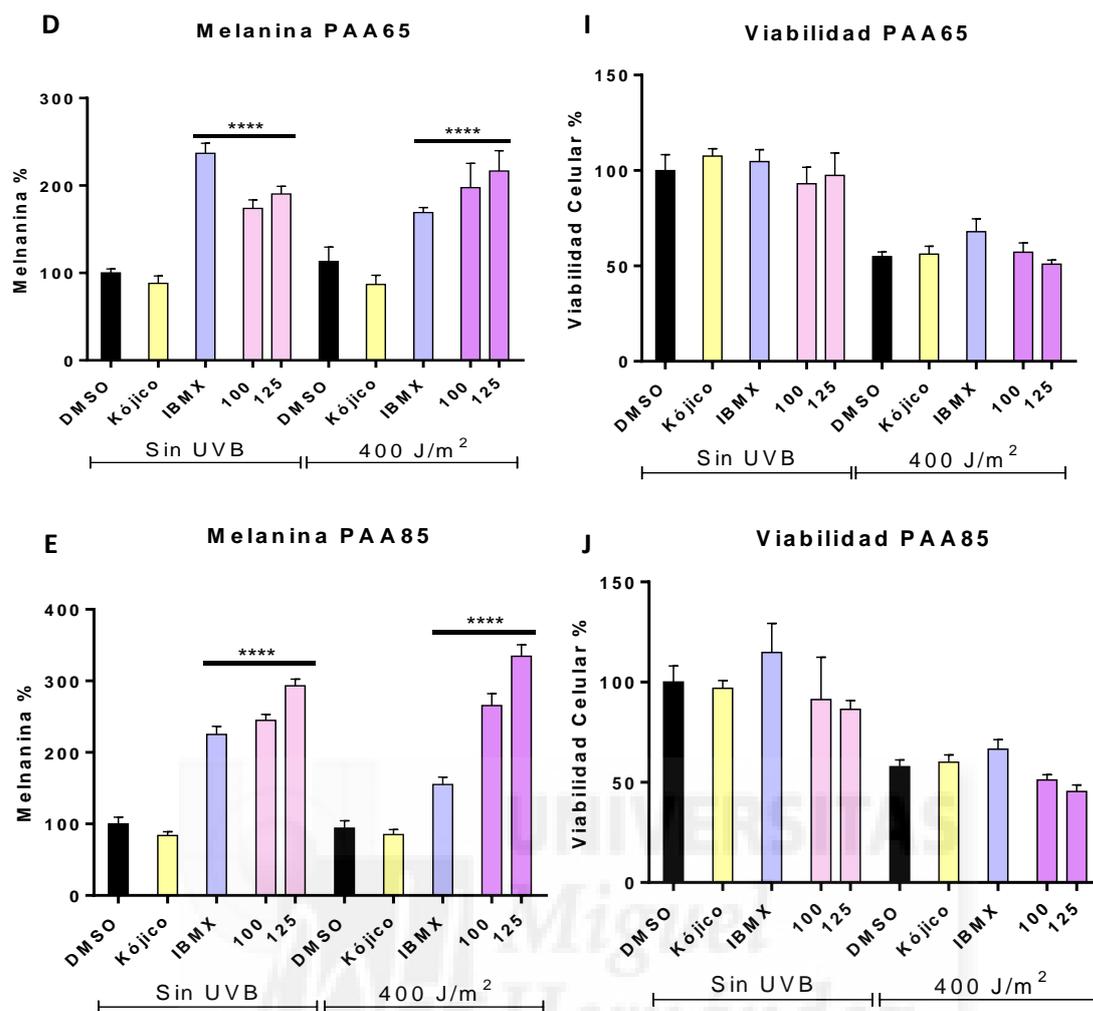


Figura 12: Efecto de los 5 extractos a distintas concentraciones en la inducción de la melanogénesis y viabilidad sin irradiación previa o tras la irradiación con 400 J/m² de UVB. **A-E** representan el porcentaje de melanina obtenido con el tratamiento con los extractos ES2, ES4, ES6, PAA65 y PAA85 respectivamente sin irradiación o tras la irradiación con UVB. **F-J** representa la viabilidad en el mismo orden y con las mismas condiciones. Los datos están expresados como la media ± DE (n= 6) determinada en porcentaje melanina o viabilidad en función del extracto. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) y **** ($p < 0,0001$) indican las diferencias significativas de cada condición respecto al control de DMSO irradiado o sin irradiar según corresponda.

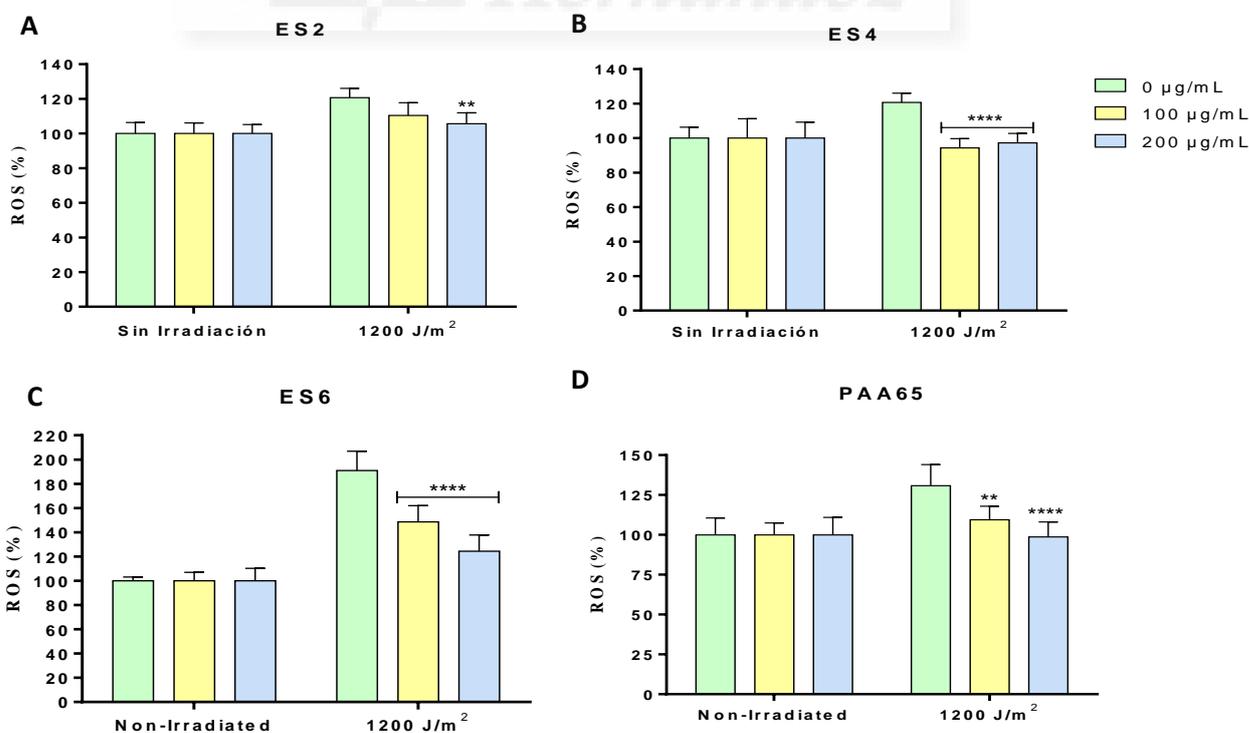
Todos los extractos siguen la misma tendencia mostrada sin irradiación, no se aprecian diferencias significativas en la melanina sintetizada en presencia o ausencia de radiación UVB junto con los tratamientos. En cambio, sí hay diferencias significativas en la cantidad de melanina sintetizada en las células irradiadas y tratadas con el control IBMX en comparación a las células tratadas con IBMX sin irradiación.

En cuanto a la viabilidad celular, destaca la reducción de la población celular de los controles debido a la irradiación, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en el ensayo anterior. Las diferencias entre la melanina producida por el IBMX con o sin irradiación puede deberse a esta toxicidad que produce la irradiación con UVB. Sin embargo, los extractos con irradiación presentan mayor melanina que el control IBMX, a diferencia de lo que sucede en ausencia de irradiación.

5.7.-Fotoprotección de los extractos

El ensayo de fotoprotección concluye el cierre del ciclo de capacidades bioactivas, relacionadas con la protección de la piel frente a la radiación solar. En este ensayo se examina la capacidad de estos extractos como fotoprotectores frente a la radiación UVB. La capacidad de fotoprotección se mide mediante la disminución de la fluorescencia emitida por la sonda DCF-DA, que aumenta en presencia de ROS.

Se determinó la capacidad fotoprotectora de los ensayos en base a su capacidad de disminuir la producción de ROS tras la irradiación con 1200 J/m² de UVB. Para ello se utilizaron dos concentraciones de los distintos extractos, 100 µg/mL y 200 µg/mL, durante la irradiación y se comparó la concentración de ROS en porcentaje entre las células irradiadas y las no irradiadas (Figura 13).



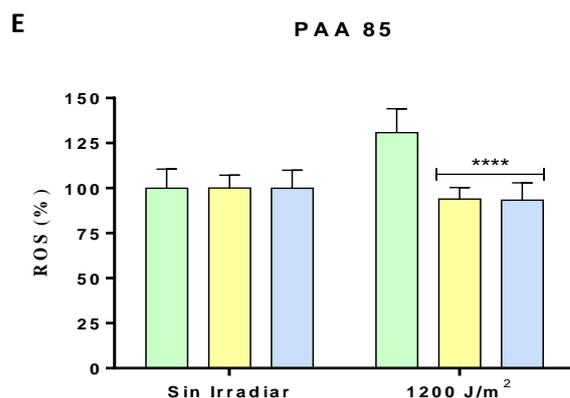


Figura 13: Porcentaje de ROS en células sin irradiar e irradiadas a 1200 J/m² de UVB con los distintos extractos a 100 y 200 µg/mL. **A-E** representa los extractos ES2, ES4, ES6, PAA65 y PAA85. El color verde corresponde a una concentración de extracto de 0 µg/mL, el amarillo a 100 µg/mL y el azul 200 µg/mL. Los datos están expresados como la media ± DE (n= 8) determinada en porcentaje de melanina en función del control y el tiempo. ** (p<0,01) y **** (p<0,0001) indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de 0 µg/mL de extracto.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la concentración de ROS de todos los extractos probados. Además, se obtuvo una dosis-respuesta en los extractos ES2, ES6 y PAA65.

Con el fin de aportar los datos de una forma más clara se calculó el porcentaje de inhibición del estrés oxidativo para las distintas concentraciones de los extractos utilizados (**Tabla 2**).

Concentración (µg/mL)	Inhibición del estrés oxidativo (%)				
Extractos	ES2	ES4	ES6	PAA65	PAA85
100	49,66	127,63	46,60	69,36	119,87
200	72,98	113,22	73,28	104,16	121,52

Tabla 2: Porcentaje de inhibición del estrés oxidativo de los distintos extractos a 100 y 200 µg/mL respecto al control sin tratamiento.

En el ensayo de fotoprotección se puede observar que todos los extractos presentan una inhibición del estrés oxidativo. El extracto PAA85 es el que mayor efecto fotoprotector posee, llegando a disminuir hasta un 122% el estrés oxidativo respecto al control irradiado sin tratamiento.

6.-Discusión de resultados

El presente trabajo de investigación pretende estudiar y encontrar posibles extractos vegetales con propiedades bioactivas capaces de mejorar nuestra salud. Dicha mejora de la salud se enfoca desde el punto de vista de la salud de la piel y las distintas agresiones que sufre desde el exterior, al tratarse del órgano barrera, el cual sufre en gran medida los daños de la radiación solar sobre los cuales se centra la actividad de los extractos utilizados. La actividad desempeñada por estos extractos radica en la estimulación del organismo de los mecanismos de defensa endógenos que presenta, como la producción del pigmento melanina como defensa natural ante las radiaciones solares, cuya capacidad de penetración y energía comprometen la salud de las personas que quedan expuestas durante un periodo prolongado.

Con respecto a los resultados bioquímicos obtenidos se observa un alto valor de la capacidad antioxidante, como se puede comparar con diferentes extractos vegetales, además se observa una relación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante, la cual fue analizada mediante distintos métodos basados en diferentes mecanismos [48, 49].

Los resultados presentados referentes a la capacidad antioxidante y el porcentaje de melanina generado se encuentran relacionados (**Tabla 1 y Figura 8**). Ambos factores podrían estar unidos, ya que los extractos que han mostrado un mayor porcentaje de producción de melanina también han presentado los valores más altos de capacidad antioxidante. Estos datos indican que podría existir algún tipo de relación molecular de los polifenoles en el que estaría involucrado algún proceso o enzima clave en la síntesis de melanina que también se relacione con la actividad antioxidante[52]. Una de las enzimas cuyo papel es fundamental y la cual podría ser el artefacto afectado por la actividad de los extractos vegetales es la enzima tirosinasa, que tiene una función en el inicio del proceso general de la síntesis de melanina y posteriormente en la catalización de los pasos finales en la obtención de la eumelanina. Por tanto, se postula que un posible mecanismo mediante el cual los extractos aumentan la melanogénesis es la inducción de la tirosinasa, debido a la interacción de la misma con grupos de polifenoles vegetales [53], que a su vez están relacionados con la capacidad antioxidante.

La melanina presentada en los resultados de los distintos ensayos ha sido siempre la melanina extracelular [3]. Esto se debe a que hay una relación de función protectora entre los melanocitos y los queratinocitos, ya que como se ha comentado anteriormente, se trata de un proceso en el que ambos tipos celulares juegan un papel condicionado el uno por el otro [8]. Esta relación condiciona que la melanina funcional en la protección sea la extracelular, debido a que dicha

melanina es la suministrada a los queratinocitos, los cuales en ese periodo se encuentran en su proceso de maduración-migración, desde las capas internas de la piel, donde interaccionan con los melanocitos, hacia las capas más externas [12]. Una vez allí efectúan la función de apantallamiento de las radiaciones solares mediante la melanina extracelular suministrada.

La radiación UVA no induce la melanogénesis de la línea celular B16-F10 con el protocolo seguido (**Figura 11**). Esto puede ser debido a que este tipo de radiación no induce ningún tipo de mecanismo mediante el cual, el sistema integumentario produzca una respuesta mediante la síntesis de melanina [20]. Tan solo se observa que este tipo de radiación produce una oxidación de la melanina ya existente, pero sin ningún tipo de beneficio para la piel, ya que esta oxidación confiere un tono ligeramente bronceado, pero cuya pérdida se produce al cabo de unas horas [21].

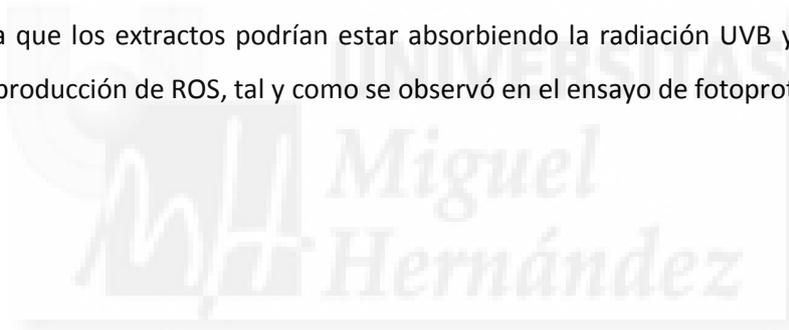
Los distintos extractos produjeron la inducción de melanogénesis a distintas concentraciones. El extracto ES4 fue el único que no mostró una respuesta dosis-efecto. Este resultado puede estar condicionado por dos motivos: en primer lugar, se conoce que la ruta de la síntesis de melanina posee distintos pasos en los que puede verse afectado su correcto funcionamiento, por lo que se puede ser que este extracto afecte a dicho proceso en otro punto distinto al del resto de extractos, afecte a otro paso o componente de la ruta o que actúe mediante una vía distinta [10]. El otro motivo podría ser que el extracto presenta su máximo efecto a concentraciones bajas, produciéndose una saturación al aumentar la concentración y por lo tanto no hay un mayor efecto.

Asimismo, el extracto ES6 es responsable de los mejores resultados, presenta una gran eficacia como inductor de la melanogénesis, llega incluso a duplicar el resultado obtenido en el valor del IBMX a la concentración del extracto más alta administrada (**Figura 8**). Esto podría deberse a que el control IBMX y el extracto actúan mediante vías diferentes. El IBMX aumenta los niveles de cAMP, involucrada en la activación de la proteína MITF, que juega un papel fundamental en la actividad de la enzima tirosinasa. El extracto ES6, al ser de origen vegetal puede que actúe directamente sobre la enzima tirosinasa, ya que existen precedentes de extractos vegetales [54] o simplemente posee una mayor actividad, sin embargo posee una alta toxicidad.

En el ensayo de irradiación con UVB se observó un suceso interesante en el que se ve involucrado el control positivo (IBMX), en relación con la síntesis de melanina en presencia y ausencia de radiación UVB. El porcentaje de melanina sintetizado por la línea celular, habiendo sido tratada con IBMX e irradiada, es menor que en ausencia de radiación a pesar de que ambos factores, irradiación con UVB e IBMX, son inductores de la melanogénesis (**Figura 12**) [22, 55]. Esto podría

deberse a que la viabilidad de las células irradiadas disminuye en un rango de 40-50% (**Figura 10**). Por lo tanto, existe una síntesis menor de melanina en comparación con las células sin irradiar, debido al menor número de células viables [56].

Los ensayos de fotoprotección mostraron una inhibición del estrés oxidativo producido por la irradiación en presencia de los extractos en comparación con la irradiación sin extractos. (**Figura 13**). Estos resultados pueden explicarse mediante la presencia de polifenoles, de los cuales se deriva también una característica relacionada con la protección frente a radiaciones solares[57]. Como se ha comentado anteriormente, se determinó la alta presencia de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos vegetales mediante ensayos bioquímicos. Estos polifenoles, y más concretamente los flavonoles y las flavanonas, absorben dentro del rango de emisión de la radiación UVB. Esto explicaría que dichas moléculas absorban la radiación y no se produzca el efecto nocivo para la salud de la piel, bien sea mediante daño en el material genético o en la formación de ROS[58]. Mediante un ensayo de espectrofotometría se mostró que los extractos absorben en el rango del UVB. Ésta podría ser la explicación al efecto de fotoprotección observado, ya que los extractos podrían estar absorbiendo la radiación UVB y de esta forma disminuye la producción de ROS, tal y como se observó en el ensayo de fotoprotección.



7.-Conclusiones y perspectivas futuras

En el presente estudio se han estudiado las capacidades antioxidantes, inductoras de la melanogénesis y fotoprotectoras de cinco extractos vegetales procedentes de plantas de origen mediterráneo y tropical.

- 1.-Los extractos presentan un alto contenido fenólico y capacidad antioxidante, certificando la capacidad de los extractos en la neutralización de ROS.
- 2.-Se observa una relación directamente proporcional entre la capacidad antioxidante de los extractos y la presencia de compuestos fenólicos.
- 3.-El estudio certifica la capacidad inductora de la melanogénesis de los cinco extractos, si bien es necesario tener en cuenta la toxicidad de algunos de ellos para mejorar los resultados en un futuro.
- 4.-Se corrobora la capacidad fotoprotectora de los cinco extractos mostrada en la línea celular de queratinocitos, al absorber la radiación UVB en un rango de longitud de onda localizado en torno a 280nm.
- 5.-Se postula la posibilidad de la incorporación de estos extractos vegetales en productos relacionados con el ámbito cosmético-cosmecéutico.
- 6.-Queda pendiente aclarar los mecanismos moleculares de acción sobre la melanogénesis.

8.-Referencias

1. Kolarsick, P.A.J., M.A. Kolarsick, and C. Goodwin, *Anatomy and Physiology of the Skin*. Journal of the Dermatology Nurses' Association, 2011. **3**(4): p. 203-213.
2. Institute, N.C. *Skin Cancer: Melanoma*. [Public Institution]; Available from: <https://training.seer.cancer.gov/melanoma/anatomy/>.
3. McLafferty, E., C. Hendry, and F. Alistair, *The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin*. Nurs Stand, 2012. **27**(3): p. 35-42.
4. Costanzo, A., et al., *Programmed cell death in the skin*. Int J Dev Biol, 2015. **59**(1-3): p. 73-8.
5. UniProt, *P02452 (CO1A1_HUMAN)*. 10 May 2017.
6. Cichorek, M., et al., *Skin melanocytes: biology and development*. Postepy Dermatol Alergol, 2013. **30**(1): p. 30-41.
7. Sommer, L., *Generation of melanocytes from neural crest cells*. Pigment Cell Melanoma Res, 2011. **24**(3): p. 411-21.
8. Hirobe, T., *How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated?* Pigment Cell Melanoma Res, 2011. **24**(3): p. 462-78.
9. Le Pape, E., et al., *Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor*. Pigment Cell Melanoma Res, 2008. **21**(4): p. 477-86.
10. D'Mello, S.A., et al., *Signaling Pathways in Melanogenesis*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).
11. Meredith, P. and T. Sarna, *The physical and chemical properties of eumelanin*. Pigment Cell Res, 2006. **19**(6): p. 572-94.
12. Ando, H., et al., *Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(4): p. 1222-9.
13. Tarle, R.G., et al., *Vitiligo--part 1*. An Bras Dermatol, 2014. **89**(3): p. 461-70.
14. Garone, M., J. Howard, and J. Fabrikant, *A review of common tanning methods*. J Clin Aesthet Dermatol, 2015. **8**(2): p. 43-7.
15. Hussein, N., *Colour of Life Achievements: Historical and Media Influence of Identity Formation Based on Skin Colour in South Asia*. Journal of Intercultural Studies, 2010.
16. Smit, N., J. Vicanova, and S. Pavel, *The hunt for natural skin whitening agents*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(12): p. 5326-49.
17. Matts, P.J., *Solar ultraviolet radiation: definitions and terminology*. Dermatol Clin, 2006. **24**(1): p. 1-8.
18. Grebe-Elli, O.P.a.J., *Planck's radiation law, the light quantum, and the prehistory of indistinguishability in the teaching of quantum mechanics*. European Journal of Physics, 2017.
19. Dale Wilson, B., S. Moon, and F. Armstrong, *Comprehensive review of ultraviolet radiation and the current status on sunscreens*. J Clin Aesthet Dermatol, 2012. **5**(9): p. 18-23.
20. Miyamura, Y., et al., *The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin*. Pigment Cell Melanoma Res, 2011. **24**(1): p. 136-47.
21. Brenner, M. and V.J. Hearing, *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(3): p. 539-49.
22. Milenko Stanojeviæ, Z.S., Dragan Jovanoviæ, Milena Stojiljkoviæ, *Ultraviolet radiation and melanogenesis* Archive of Oncology 2004.
23. Holick, M.F., *Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need?* Adv Exp Med Biol, 2008. **624**: p. 1-15.

24. Rinnerthaler, M., et al., *Oxidative stress in aging human skin*. *Biomolecules*, 2015. **5**(2): p. 545-89.
25. Meadows, C., et al., *Age-related NADH oxidase (arNOX)-catalyzed oxidative damage to skin proteins*. *Arch Dermatol Res*, 2014. **306**(7): p. 645-52.
26. Lephart, E.D., *Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms*. *Ageing Res Rev*, 2016. **31**: p. 36-54.
27. Pillai, S., C. Oresajo, and J. Hayward, *Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review*. *Int J Cosmet Sci*, 2005. **27**(1): p. 17-34.
28. Pittayapruerk, P., et al., *Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(6).
29. Petrovska, B.B., *Historical review of medicinal plants' usage*. *Pharmacogn Rev*, 2012. **6**(11): p. 1-5.
30. Lobo, V., et al., *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. *Pharmacogn Rev*, 2010. **4**(8): p. 118-26.
31. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2009. **2**(5): p. 270-8.
32. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(6): p. 1583-606.
33. Duduku Krishnaiah, R.S., Rajesh Nithyanandam, *A review of the antioxidant potential of medicinal plant species*. *ICHEM E Journals*, 2011.
34. Perez-Fons, L., M.T. Garzon, and V. Micol, *Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(1): p. 161-71.
35. Beltran-Debon, R., et al., *The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans*. *Phytomedicine*, 2010. **17**(3-4): p. 186-91.
36. Pusztahelyi, T., I.J. Holb, and I. Pocsí, *Secondary metabolites in fungus-plant interactions*. *Front Plant Sci*, 2015. **6**: p. 573.
37. Perez-Sanchez, A., et al., *Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model*. *J Dermatol Sci*, 2016. **84**(2): p. 169-177.
38. Singh, S.K., et al., *The effects of *Sophora angustifolia* and other natural plant extracts on melanogenesis and melanin transfer in human skin cells*. *Exp Dermatol*, 2013. **22**(1): p. 67-9.
39. Berker, K.I., et al., *Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**(20): p. 4783-91.
40. Rubio, C.P., et al., *Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update*. *BMC Vet Res*, 2016. **12**(1): p. 166.
41. Payne, A.C., et al., *Antioxidant assays - consistent findings from FRAP and ORAC reveal a negative impact of organic cultivation on antioxidant potential in spinach but not watercress or rocket leaves*. *Food Sci Nutr*, 2013. **1**(6): p. 439-44.
42. Bolling, B.W., J.B. Blumberg, and C.Y. Chen, *Extraction methods determine the antioxidant capacity and induction of quinone reductase by soy products in vitro*. *Food Chem*, 2009. **116**(1): p. 351-355.
43. Barrajon-Catalan, E., et al., *Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells*. *Food Chem Toxicol*, 2010. **48**(8-9): p. 2273-82.
44. Wu, C.Y., J.H. Pang, and S.T. Huang, *Inhibition of melanogenesis in murine B16/F10 melanoma cells by *Ligusticum sinensis* Oliv.* *Am J Chin Med*, 2006. **34**(3): p. 523-33.

45. Chen, L.G., et al., *Melanogenesis inhibition by gallotannins from Chinese galls in B16 mouse melanoma cells*. Biol Pharm Bull, 2009. **32**(8): p. 1447-52.
46. Johnson, S. and P. Rabinovitch, *Ex vivo imaging of excised tissue using vital dyes and confocal microscopy*. Curr Protoc Cytom, 2012. **Chapter 9**: p. Unit 9 39.
47. Edward Owusu-Ansah , A.Y.U.B., *A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species*. nature, 2008.
48. Shan, B., et al., *Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(20): p. 7749-59.
49. Borrás-Linares, I., et al., *Permeability Study of Polyphenols Derived from a Phenolic-Enriched Hibiscus sabdariffa Extract by UHPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 18396-411.
50. Temraz, A. and W.H. El-Tantawy, *Characterization of antioxidant activity of extract from Artemisia vulgaris*. Pak J Pharm Sci, 2008. **21**(4): p. 321-6.
51. Fernandez-Arroyo, S., et al., *Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from Hibiscus sabdariffa in rats and associated antioxidant status*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(10): p. 1590-5.
52. Kao, Y.Y., et al., *Evaluation of the antioxidant and melanogenesis inhibitory properties of prapparatum mungo (lu-do huang)*. J Tradit Complement Med, 2013. **3**(3): p. 163-70.
53. Hanamura, T., E. Uchida, and H. Aoki, *Skin-lightening effect of a polyphenol extract from Acerola (Malpighia emarginata DC.) fruit on UV-induced pigmentation*. Biosci Biotechnol Biochem, 2008. **72**(12): p. 3211-8.
54. Huang, H.C., et al., *Inhibition of melanogenesis and antioxidant properties of Magnolia grandiflora L. flower extract*. BMC Complement Altern Med, 2012. **12**: p. 72.
55. Jin, M.L., et al., *Suppression of alpha-MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms*. Int J Mol Med, 2012. **29**(1): p. 119-24.
56. Lee, C.H., et al., *Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(3): p. 6414-35.
57. Rozema, J., et al., *UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels*. J Photochem Photobiol B, 2001. **62**(1-2): p. 108-17.
58. Anouar el, H., et al., *UV/Visible spectra of a series of natural and synthesised anthraquinones: experimental and quantum chemical approaches*. Springerplus, 2014. **3**: p. 233.

9.-Agradecimientos

En el presente Trabajo de Fin de Grado me veo en el deber moral, ético y personal de reconocer y agradecer, en primer lugar a mis directores del Trabajo de Fin Grado Dr. Vicente Micol Molina, Dr. Enrique Barraión Catalán y Luz María Agulló Chazarra, la oportunidad brindada y la inestimable ayuda y confianza depositadas en mí.

Quiero agradecer al Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) y todo el equipo técnico que directa e indirectamente me han ayudado en el desarrollo de mi Trabajo de Fin de Grado.

No podría olvidarme de todas las personas que han trabajado a mi lado en el grupo de investigación. Al grupo humano que han formado mi familia durante estos meses de trabajo, gracias por toda su dedicación y amabilidad a la hora de enseñarme y compartir experiencias únicas a Almudena Pérez, María Herranz, María Losada, Javier Alva, Mariló Olivares, Verónica Ruíz, Sara González, Maite Garzón, Belén Alix y María Teresa Castaño.

Agradecer a César Alonso, Noelia Sánchez y Gustavo, los pezqueñines que hemos estado trabajando día tras día, para conseguir nuestro merecido premio. Y a las amistades convertidas en familia que me llevo a lo largo de estos cuatro años de carrera, en especial a los "Ghetto Boys".

Quiero agradecer especilamente a la mejor investigadora del IBMC, Luz María Agulló Chazarra por armarse de paciencia y cariño parar guiarme, en estos mis primero pasos en la vereda del ámbito de la investigación.

Por último agradecer a mis padres y mis hermanos haber sido mi soporte y mi faro de Alejandría en mis buenas y malas experiencias, una familia de la que siempre me sentiré orgulloso y querido.

Más allá de la noche que me cubre,
negra como el abismo insondable,
doy gracias al dios que fuere
por mi alma inconquistable.

En las azarosas garras de las circunstancias
nunca he llorado ni pestañado.
Sometido a los golpes del destino
mi cabeza ensangrentada sigue erguida.

Más allá de este lugar de cólera y lágrimas
donde yacen los horrores de la sombra,
sin embargo, la amenaza de los años
encuentra, y me encontrará sin miedo.

No importa cuán estrecho sea el camino,
cuán cargada de castigos la sentencia,
yo soy el amo de mi destino:
Soy el capitán de mi alma.

William Hernest Henley

