
La enzima tirosinasa: 2. Inhibidores de origen natural y sintético

Gerardo M. Casañola-Martín,^{1,2*} Yovani Marrero-Ponce,^{2,3} Huong Le-Thi-Thu,² Mahmud Tareq Hassan Khan,⁴ Francisco Torrens,³ Antonio Rescigno,⁵ y Concepción Abad.⁶

¹Centro de Información y Gestión Tecnológica, Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), 65100, Ciego de Avila, Cuba ²Unit of Computer-Aided Molecular "Biosilico" Discovery and Bioinformatic Research (CAMD-BIR Unit), Faculty of Chemistry-Pharmacy, Central University of Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba. ³Institut Universitari de Ciència Molecular, Universitat de València, Edifici d'Instituts de Paterna, Polígon la Coma s/n (detras de Canal Nou) P. O. Box 22085, E-46071 (València), Spain. ⁴ Present address: Center for Pharmaceutical Biotechnology, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, USA. ⁵Sezione di Chimica Biologica, Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Cagliari, Cittadella Universitaria, 09042 Monserrato (CA), Italy. ⁶Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, E-46100 Burjassot, Spain.

Tyrosinase enzyme: 2. Inhibitors from natural and synthetic origins

L'enzim tirosinasa: 2. Inhibidors d'origen natural i sintètic

Recibido: 13 de junio de 2012; revisado y aceptado: 24 de abril de 2013

RESUMEN

En este trabajo se abordan de manera general los compuestos inhibidores de la tirosinasa, la enzima limitante y el pilar fundamental para el control de la pigmentación en la piel de los humanos. Se presentan las principales características de los agentes despigmentantes utilizados en la práctica médica. También se muestran los compuestos estudiados hasta la actualidad, los que son agrupados teniendo en cuenta su origen: naturales, sintéticos y fármacos con otros usos terapéuticos, descubiertos con actividad inhibidora contra la enzima. Finalmente se discuten los últimos avances en el campo de la quimioinformática y la modelación molecular relacionados con el estudio de la enzima y sus inhibidores.

Palabras clave: Inhibidores de la tirosinasa, Compuestos de síntesis, Productos naturales, Fármacos.

SUMMARY

In this work there are tackled in a general way the tyrosinase inhibitor compounds, the limiting enzyme and the fundamental key for the skin pigmentation control in human beings. The main characteristics of the depigmenting agents used in the medical practice are depicted. Besides, the compounds studied until nowadays are showed, which are grouped taking into account its origin: naturals, synthetics and drug with other therapeutic uses, discovered with inhibitory activity against the enzyme. Finally the last advances in the cheminformatic and molecular modeling field related with the study of the enzyme and its inhibitors are discussed.

Keywords: Tyrosinase inhibitors, Synthetic compounds, Natural products, Drugs

RESUM

En aquest treball s'aborden de manera general els compostos inhibidors de la tirosinasa, l'enzim limitant i el pilar fonamental per al control de la pigmentació en la pell dels humans. Es presenten les principals característiques dels agents despigmentants utilitzats en la pràctica mèdica. També es mostren els compostos estudiats fins a l'actualitat, els quals són agrupats tenint en compte el seu origen: naturals, sintètics i fàrmacs amb altres usos terapèutics, descoberts amb activitat inhibidora contra l'enzim. Finalment, es discuteixen els últims avenços en el camp de la quimioinformàtica i la modelació molecular relacionats amb l'estudi de l'enzim i els seus inhibidors.

Paraules clau: Inhibidors de la tirosinasa, compostos de síntesi, productes naturals, fàrmacs.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: gmaikelc@gmail.com or gmaikelc@yahoo.es; **Fax:** 53-43-223066 (Cuba) and 963543156 (València); **Phone:** 53-33-201357 [or 53-33-223066] (Cuba) and 963543156 (València) **URL:** <http://www.uv.es/yoma/Documents/01 CAMD-BIR Unit>

INTRODUCCIÓN

La enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1) ha estado bajo la atención de la comunidad científica internacional por sus múltiples aplicaciones en los campos de la agricultura, la medicina, los cosméticos y los alimentos. Como la tirosinasa juega un rol fundamental en la síntesis de la melanina, debido a que regula directamente la cantidad de melanina producida, mientras que otras enzimas solo modifican el tipo de melanina que es sintetizada en la ruta bioquímica de la pigmentación,¹ su inhibición se ha convertido en una de las estrategias más importantes para el desarrollo de nuevos agentes despigmentantes² y ha cobrado una gran importancia en los productos médicos³ y cosméticos.⁴

Los inhibidores farmacológicos de la tirosinasa u otra ruta melanogénica pueden servir como inhibidores tópicos *de novo* de la melanogénesis, teniendo efecto en el blanqueamiento de la piel.⁵ Los usos de los productos blanqueadores de la piel varían entre las diferentes culturas y razas alrededor del mundo. Por lo tanto, el uso de terapias genuinas va desde su uso en enfermedades de la piel hasta productos de belleza.⁶ Por ello se han realizado muchos estudios relacionados con la tirosinasa y sus inhibidores a lo largo de la última centuria y estos continúan hasta nuestros días.⁷⁻⁹

Un grupo importante de inhibidores del pardeamiento esta constituido por compuestos análogos estructuralmente con sustratos fenólicos. Estos muestran generalmente una inhibición competitiva por estos sustratos, aunque tal inhibición puede variar dependiendo del tipo de enzima y el sustrato utilizado.¹⁰

FÁRMACOS DESPIGMENTANTES UTILIZADOS EN LA TERAPÉUTICA CLÍNICA

La hidroquinona (HQ) es el agente por excelencia para el blanqueamiento de la piel. Esta se encuentra comúnmente en alimentos tales como el trigo, las bayas, el café y el té, que son desintoxicados en compuestos inertes en el hígado.¹¹ La hidroquinona ha sido el tratamiento fundamental durante los últimos 50 años, y es usado ampliamente con algunas excepciones.¹¹ Este compuesto inhibe la tirosinasa a través de la interacción con el cobre del sitio activo, la alteración de las funciones del melanosoma, la disipación de la generación del glutatión de las especies reactivas del oxígeno y el subsecuente daño oxidativo de la membrana de lípidos y proteínas que puede jugar un rol en el efecto de despigmentación de la hidroquinona (HQ).² La HQ puede interferir con la pigmentación incluso a través de: 1) los enlaces covalentes de la histidina o la interacción con cobres en el sitio activo de la tirosinasa,¹² 2) la inhibición de la síntesis del ADN y ARN y 3) la alteración de la formación de melanosoma,¹³ actuando como un sustrato pobre para la tirosinasa, compitiendo por la oxidación de la tirosinasa en los melanocitos activos. Sin embargo, su citotoxicidad y los efectos colaterales, tales como hipomelanosis perenne o amelanosis son bastante altos, por lo que sus dosis se limitan generalmente a concentraciones del 2%, que resultan adecuadas para mejorar la hiper melanosis de un 14 a un 70% de los pacientes. El uso clínico entonces esta limitado a obtener una despigmentación generalizada en pacientes con vitiligo difundido.¹⁴ Las complicaciones por el uso de la hidroquinona incluyen hipopigmentación y dermatitis. Eventos crónicos adversos incluyen además ocronosis exógena, decoloración de la nariz, y leucoder-

ma permanente, especialmente en mujeres africanas. El resultado de éste y otros efectos adversos tales como la cronosis en las naciones africanas,¹⁵ ha hecho que el uso de la hidroquinona haya sido descartado en la mayoría de los países.¹⁶ Otros pocos fármacos despigmentantes son usados como agentes blanqueadores de la piel, entre ellos, el arbutin, el ácido kójico y la L-mimosina,¹⁷ están entre los más populares pero su uso se ha limitado por algunas desventajas presentadas en su aplicación en humanos.¹⁸⁻¹⁹ Esto ha incidido en el incremento en la búsqueda de agentes despigmentantes alternativos a partir plantas. La estructura de estos compuestos puede observarse en la Figura 1.

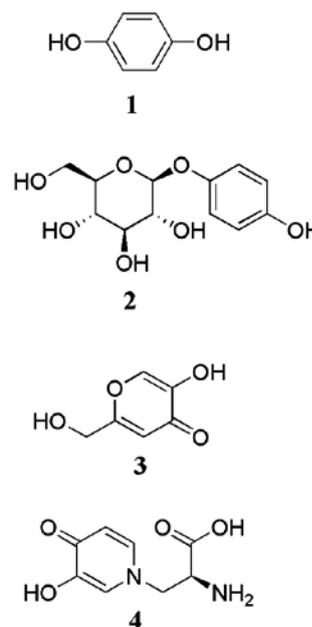


Figura 1. Fármacos despigmentantes mas utilizados en la practica medica actual: 1: Hidroquinona; 2: Arbutin; 3: Acido kójico; 4: L-mimosina.

INHIBIDORES DE ORIGEN NATURAL

La enzima tirosinasa ha sido aislada de diferentes fuentes, por ello también varias fuentes naturales han sido utilizadas en la obtención de compuestos con inhibición contra la enzima. Entre los grupos fundamentales, tenemos los hongos, bacterias y plantas. Entre ellos las plantas constituyen la fuente más amplia de inhibidores, que en la mayoría de los casos están libres de los efectos adversos,²⁰ y se ha investigado un amplio espectro de compuestos obtenidos a partir de productos naturales.

Inhibidores aislados a partir de hongos

El ácido azelaico (ácido 1,7-heptanodicarboxílico, AZA) es un compuesto natural de cadena lineal y saturado que es producido por lipoperoxidación de los ácidos grasos libres y cis esterificados por la levadura, *Pityrosporium ovale*. Este compuesto es capaz de unirse a los grupos aminos o carboxílicos, bloqueando el acceso de la tirosina al sitio activo de la enzima, comportándose como un inhibidor competitivo. El AZA inhibe la actividad tirosinasa *in vitro* ($K_i=2.73 \times 10^{-3} M$)²¹ y puede también interferir con la síntesis de ADN y la actividad mitocondrial en los melanocitos hiperactivos y anormales.²² Este IFA (Ingrediente Farmacéutico Activo) ha sido usado para el tratamiento del melasma

y la hiperpigmentación postinflamatoria²³ y para disminuir la progresión de lentigo maligno a melanoma.²⁴

El ácido kójico [5-hidroxi-2-(hidroximetil)-g-pirona], es un metabolito de hongos producido por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium*,²⁵ este antibiótico es un buen agente quelante de los metales de transición y un buen removedor de radicales libres. Además, inhibe la tirosinasa de varias especies de *Aspergillus*, *N. crassa* y champiñones, así como los de algunas plantas y crustáceos por quelación del cobre del sitio activo de la enzima.²⁶

La metalotioneína proveniente de *Aspergillus niger*²⁷ posee una gran avidez para quelar el cobre en el sitio activo de la tirosinasa de champiñón, actuando además como un inhibidor de gran fortaleza. Estudios recientes muestran además que la agaritina, procedente de *Agaricus Bisporus*, inhibe la tirosinasa de champiñón *in vitro* y muestra una inhibición no competitiva de L-DOPA y una inhibición competitiva de L-tirosina.²⁸

Derivados de hidroquinona

Arbutin: Es un β -glucósido natural de la HQ usado comúnmente. El arbutin inhibe la tirosinasa competitiva y reversiblemente sin afectar el proceso de transcripción del ARNm de los melanocitos cultivados de humanos a concentraciones no tóxicas en forma dependiente de las dosis. Este compuesto también inhibe la maduración de los melanosomas y es menos tóxico a los melanocitos en comparación con la HQ. A pesar de la seguridad del arbutin como agente para blanquear la piel y aminorar las lesiones hiperpigmentadas, algunos trabajos no confirman sus efectos en ensayos clínicos.²⁹

Polifenoles

Los polifenoles de plantas se refieren usualmente a un grupo diverso de compuestos que contienen funciones fenólicas múltiples. Estos compuestos son producidos como metabolitos secundarios por la mayoría de las plantas, en las cuales tienen numerosas actividades biológicas. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son también conocidos como taninos vegetales por su rol en el color de varias flores. Varios de ellos son compuestos estructuralmente complejos presentes en las raíces, tallos y hojas de plantas, mientras que otros son compuestos simples presentes en la mayoría de las frutas frescas, vegetales y el té. Algunos inhibidores potentes tales como el kaempferol,³⁰ quercetin,³¹ kurarinona y kushnol F³² han sido aislados de varias plantas.

Todos estos flavonoides inhiben la enzima debido a su habilidad de quelar el cobre en el sitio activo. Además, estudios posteriores en este grupo de compuestos, establecieron que los flavonoides que contienen grupo α -ceto potencian la actividad inhibidora de la tirosinasa.³³ Esto podría ser explicado en términos de la similitud entre los grupos dihidroxifenilos en L-DOPA y el grupo α -ceto en los flavonoides.

Otro compuesto importante de este grupo es el ácido gálico. En general los galatos, el ácido gálico y sus ésteres, son ampliamente utilizados como aditivos en la industria alimenticia. El ácido gálico, el compuesto representativo de los galatos, inhibe la oxidación de la L-DOPA catalizada por la tirosinasa.³⁴ Además, el ácido gálico por sí mismo parece actuar como sustrato siendo oxidado antes que la L-DOPA, lo cual acelera la oxidación del ácido gálico. Las *o*-quinonas resultantes del ácido gálico pueden condensarse con otra molécula a través de una adición

de Michael, dando un intermediario quinol-quinona relativamente estable.³⁵ Se señala, además, que el largo de la cadena está relacionado con la inhibición de la actividad tirosinasa y que los galatos con un incremento de la hidrofobicidad se vuelven más resistentes a ser oxidados por la enzima debido a la perturbación de la estructura terciaria de la enzima.³⁶

También se ha observado que el ácido *p*-cumárico³⁷ inhibe la actividad monofenolasa y difenolasa y que los grupos polares hidroxilo en posiciones *para* incrementan la actividad inhibidora monofenolasa, mientras que disminuyen la actividad inhibidora difenolasa. Otro compuesto con fuerte actividad inhibidora descrita es el oxiresveratrol,³⁸ lo cual es debido a la presencia de un número máximo de grupos hidroxilo en el anillo. Sin embargo, se carece de criterios para una explicación clara en cuanto a su actividad inhibidora y la estructura.

Aldehídos y otros compuestos relacionados

Un gran número de aldehídos y otros derivados también se han aislado y caracterizado como inhibidores de la tirosinasa de champiñón. Entre estos compuestos está el transcinamaldehído, (2E)-alquenes, 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído, anisaldehído, cuminaldehído, el ácido cúmico, el ácido 3,4-dihidroxicinámico y el ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico.¹⁹ Como se conoce que el grupo aldehído reacciona con grupos nucleofílicos de importancia biológica tales como grupos sulfhídricos, hidroxilos y aminos, se ha propuesto que su efecto inhibidor puede deberse a la formación de una base de Schiff (imina) con un grupo amino primario de la enzima. La comparación de las actividades inhibidoras de varios aldehídos y compuestos relacionados estructuralmente como el ácido cinámico, el ácido anísico, el ácido cúmico, y el ácido benzoico, han demostrado que los cuminaldehídos son inhibidores fuertes.³⁹ Es interesante en este caso hacer notar que los grupos electronadores (isopropilo y metoxi) en posición *para* en el cuminaldehído proporcionan una estabilidad a la base de Schiff en el sitio activo de la enzima a través de efectos inductivos. Los (2E)-alquenes no inhiben la actividad monofenolasa pero inhiben la oxidación de la L-DOPA por la tirosinasa como inhibidores no competitivos. Estos compuestos con un grupo alquílico de cadena larga pueden asociarse mejor con el sitio hidrofóbico de la proteína cercano al sitio activo binuclear.⁴⁰

Otros compuestos aislados de fuentes naturales

Otra amplia gama de compuestos han sido aislados de diferentes plantas, por ejemplo, una familia de triterpenos pentacíclicos a partir de *Rhododendron collettianum*,⁴¹ una serie de derivados de *N-trans*-feruloyltiramina de la planta *Enicosanthum cupulare*,⁴² y metabolitos de otras plantas como *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae),⁴³ *Polygonum hydropiper* L. (Benitade),⁴⁴ *Kaempferia pandurata* Roxb.,⁴⁵ *Broussonetia papyrifera*,⁴⁶ *Arnica Montana*,⁴⁷ *Marrubium velutinum* y *Marrubium cylleneum*.⁴⁸

Compuestos de otras fuentes se muestran con actividad inhibidora contra la enzima, obtenidos a partir del aceite de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum*,⁴⁹ del agua de desecho producto de la destilación del ron,⁵⁰ de la melaza de la caña de azúcar,⁵¹ entre otras.⁵²⁻⁵³

INHIBIDORES DE ORIGEN SINTÉTICO

Un número considerable de compuestos de origen sintético tales como, hidroxilamina, tioles, ácidos aromáticos

carboxílicos, se describen con actividad inhibitoria contra la enzima tirosinasa. Un inhibidor potente entre una familia de hidroxilamina N-sustituidos N-nitroso es la *N-ciclo-pentil-N-nitrosohidroxilamina*. La remoción de un grupo nitroso o hidroxilo da como resultado una pérdida total de la actividad inhibitoria contra la enzima, esto sugiere que ambos grupos en este tipo de compuestos son esenciales para la actividad biológica, lo cual ocurre probablemente por interacción con el ión cobre del sitio activo del enzima.⁵⁴

La cisteína y un amplio rango de ácidos carboxílicos aromáticos han sido también indicados como inhibidores de la actividad de tirosinasa de champiñón purificada comercialmente. Estos compuestos tienen inhibiciones de tipo competitiva, no-competitiva, mixta o incompetitiva en dependencia de la naturaleza del inhibidor y el método usado para la determinación de la actividad enzimática.⁵⁵ El ácido benzóico inhibe las isoenzimas α , β , y γ de la tirosinasa de *A. bisporus* competitivamente para la reacción cresolosa, pero muestra una inhibición incompetitiva parcial para las isoenzimas α y β , y una inhibición simple competitiva para la isoenzima γ en la reacción catecolasa.⁵⁶

Otro grupo de compuestos tales como tropolona, ácido *m*-cúmarico, y resorcinol 4-sustituidos, con similitud estructural a los sustratos fenólicos e inhibición competitiva con respecto a estos sustratos, son conocidos como inhibidores de acoplamiento lento.¹⁹ Entre ellos la tropolona (2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrieno) es uno de los más potentes inhibidores de la tirosinasa. Este compuesto, es un análogo estructural de los sustratos *o*-difenílicos de la tirosinasa, así como un quelador cúprico efectivo.¹³ El hexilresorcinol es señalado como el inhibidor más efectivo en la industria alimenticia, pues es soluble en agua, estable, no-toxico (no-mutagénico y no-carcinogénico) y ha sido reconocido como seguro para su uso en la prevención y el control del pardeamiento de rebanadas de manzanas, papatas y aguacates frescos.⁵⁷ El dimetilsulfóxido (DMS) fue descrito como inhibidor competitivo de acoplamiento lento a la tirosinasa de champiñón y es el primer inhibidor volátil caracterizado.⁵⁸ El DMS tiene su rol fisiológico dentro del tejido de las plantas y su alta concentración inhibe la tirosinasa endógena, protegiendo la planta de la oxidación fenólica prematura.

También recientemente otros compuestos se muestran como inhibidores de la enzima tirosinasa por ejemplo, una familia de cromonas,⁵⁹ derivados del ácido cinámico,⁶⁰ trihidroxichalconas,⁶¹ péptidos,⁶² ácidos alquilbenzoicos,⁶³ analogos de tiosemicarbazidas,⁶⁴ de bencedioles,⁶⁵ de N-hidroxi-N'-fenilureas y N-hidroxi-N'-feniltioureas,⁶⁶ entre otros.⁶⁷⁻⁶⁹

FÁRMACOS CON OTROS USOS TERAPÉUTICOS COMO INHIBIDORES DE LA TIROSINASA

El captopril, un fármaco utilizado como antihipertensivo [(2S)-1-(3-mercapto-2-metilpropionil)-L-prolina], es capaz de prevenir la formación de melanina. Este fármaco muestra una inhibición irreversible no competitiva de la actividad monofenolasa de la tirosinasa de champiñón, mientras que exhibe una inhibición competitiva irreversible para la actividad difenolasa de la tirosinasa.⁷⁰ Se piensa que el captopril ejerce su efecto inhibitorio por quelación de los iones cobre en el sitio activo de la tirosinasa. Además, el proceso de la inhibición involucra una reacción

de intercambio de disulfuro entre el captopril y el dominio enriquecido de cisteínas en el sitio activo de la enzima.

El metimazol (1-metil-2-mercaptoimidazol) es un fármaco anti-tiroideos que inhibe las actividades mono- y di-fenolasa de la tirosinasa de champiñón.⁷¹ Siendo un inhibidor de tipo mixto. Este compuesto inhibe la actividad de la tirosinasa de champiñón de dos formas: conjugando con las *o*-quinonas, lo que provoca inhibición aparente en la formación de productos pigmentados, y quelante de cobre en el sitio activo de la enzima. Otro fármaco también señalado con actividad anti-tirosinasa es la penicilamina, el cual es usado en la terapia de la enfermedad de Wilson.⁷²

NUEVOS ENFOQUES Y TENDENCIAS EN EL ESTUDIO DE LA ENZIMA Y LOS INHIBIDORES

En los últimos años también se han realizado algunos estudios quimioinformáticos relacionados con la tirosinasa y/o sus inhibidores, la mayoría de ellos utilizando únicamente un tipo de clase química o un tipo de enzima.⁷³⁻⁷⁹ Estos modelos se consideran *locales* desde el punto de vista del dominio de aplicabilidad, pues las bases de datos utilizadas en estos estudios son congenericas (relacionadas con un mismo núcleo base químico).⁸⁰ El primero de estos estudios fue realizado por *Li y col.*,⁸¹ partiendo de una familia de 18 derivados de benzaldehídos, utilizando como descriptores moleculares las propiedades fisicoquímicas calculadas a los sustituyentes de los anillos bencénicos para correlacionar la actividad inhibitoria contra la enzima tirosinasa extraída de *Sacrophaga neobelliaria*. Otros estudios, en este caso de análisis conformacional y simulación dinámica molecular fueron realizados por *Khan y col.*, para identificar los confórmeros más activos biológicamente, en dos series de compuestos.⁸²

Además, se realizó un estudio de homología y acoplamiento molecular, donde se construyó la estructura tridimensional del sitio catalítico de la enzima a partir de dos proteínas de referencia (catecol oxidasa y hemocianina) con una similitud en las secuencias de un 40% con respecto a la tirosinasa de champiñón *Agaricus bisporus*. Esta modelación fue realizada para apoyar la comprensión de la interacción entre un inhibidor y el cobre dinuclear del sitio activo de la tirosinasa. El compuesto **1** se acopló por su anillo A (grupo 7-8-dihidroxifenil) quelando los dos cobres en el sitio activo, y además se encontró una interacción entre el grupo 3'-hidroxilo del anillo B y el residuo Asp 267 de la tirosinasa. Este modelo de acoplamiento proporciona algunos indicios para la relación estructura-actividad de los derivados de flavonoides como agentes anti-tirosinasa.⁸³

Luego de la elucidación estructural de la primera tirosinasa aislada a partir de *Streptomyces castaneoglobisporus*⁸⁴ (véase Figura 2) se realizó otro estudio utilizando esta enzima y otras para la generación de un modelo tridimensional del sitio activo de la tirosinasa de ratones para estudiar los efectos funcionales de la sustitución de los aminoácidos cercanos a los cobres del sitio activo. Aquí se demostró que el plegamiento adecuado de la proteína en el sitio activo y la glicosilación cercana es necesario para que la tirosinasa funcione de forma adecuada. Debido a la relación cercana entre la tirosinasa de ratones y la de humanos, esta misma interpretación debería ser verdadera para la tirosinasa de humanos. Es de señalar que la tirosinasa de ratones y humanos comparten un 85% de secuencia idéntica y un 92% de homología.⁸⁵

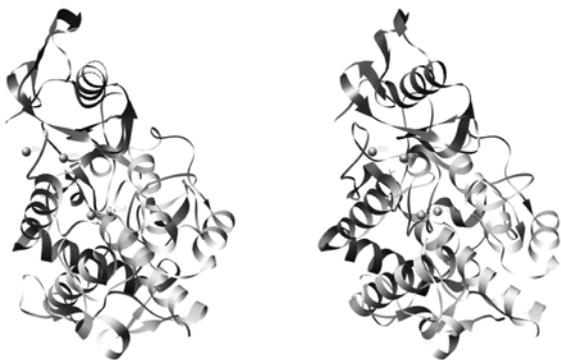


Figura 2. Vista estereoscopia de la estructura tridimensional de la primera tirosinasa aislada a partir de *Streptomyces castaneoglobisporus* (código PDB 1WXC).

Finalmente, fueron realizados dos estudios que integran la obtención de modelos QSAR usando dos técnicas de análisis del campo molecular, y métodos de acoplamiento para un análisis de la actividad inhibidora a partir de un conjunto de compuestos. En el primero de estos casos se utilizaron descriptores tri-dimensionales: análisis comparativo del campo molecular y análisis comparativo de los índices de similitud molecular (COMFA y COMSIA, por sus siglas en inglés, respectivamente). Se utilizó una base de datos de 57 compuestos pertenecientes a familias de benzaldehídos, tiosemicarbazonas benzaldehídicas y ácidos benzoicos, con actividad inhibidora medida contra *Pieris rapae*. En el segundo caso se empleó una base de datos de 38 compuestos relacionados estructuralmente. En ambos estudios se observó una buena predictibilidad de los modelos QSAR propuestos. Se realizó también un análisis de los mapas de contornos de los descriptores COMFA y COMSIA, para evaluar el efecto de cada uno de estos en la actividad en las diferentes regiones de un compuesto. También se muestra en el estudio de acoplamiento molecular en ambos casos que ocurre con la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de los compuestos acoplados al sitio activo, y el oxígeno carboxílico de los átomos de la Tyr⁹⁸, lo cual estabiliza la posición de la Tyr⁹⁸ y previene su participación en la interacción entre la fenoloxidasas y ORF378. La información derivada de estos estudios puede servir para predecir la afinidad de análogos estructurales a estos compuestos y servir como guía para una posterior modificación estructural.⁸⁶⁻⁸⁸

CONCLUSIONES

Las diferentes enfermedades relacionadas con la hiperpigmentación de la piel tienen como “diana farmacológica” fundamental para combatirla el uso de inhibidores de la enzima tirosinasa. Esta enzima se encuentra en la ruta bioquímica de la melanogénesis, y juega un rol catalítico fundamental en las reacciones de oxidación enzimática asociada a la melanogénesis. Muchos de los fármacos utilizados en la actualidad para el tratamiento de varios de estos desórdenes, utilizan compuestos que inhiben esta enzima, algunos de ellos con actividad potente como la hidroquinona o el ácido kójico, pero con algunas desventajas concernientes a su mutagenicidad, o a efectos de acoplamiento lento al sitio activo de la enzima. Sin embargo, la búsqueda de compuestos bioactivos potentes y seguros, permanece como un tópico de gran trascen-

dencia para la comunidad científica,⁸⁹⁻⁹³ pues los métodos descritos, aunque han permitido encontrar nuevos inhibidores, esto no ha sido con la rapidez que demanda la industria farmacéutica y la sociedad en sentido general. Se ha propuesto la utilización de métodos basados en acoplamiento molecular y QSARs, pero estos están limitados a una cantidad pequeña de compuestos de un subsistema molecular y enfocado a un tipo de enzima. Por otra parte, la mayoría de estos nuevos compuestos están estructuralmente relacionados con los descritos anteriormente en la literatura, lo que limita su propuesta como nuevos núcleos bases con la actividad predicha. Además, una estrategia exitosa en la búsqueda de nuevos compuestos con bioactividad debería tomar en consideración no solo el criterio basado en la eficiencia de la inhibición de la tirosinasa, sino también otros parámetros relacionados con la toxicidad, solubilidad, absorción cutánea efectiva, penetración y, estabilidad.

AGRADECIMIENTOS

M-P. Y y C-M. G. M. agradecen el programa ‘*Estades Temporals per a Investigadors Convocats*’ para una estancia de investigación en la Universidad de Valencia (2010). F. T. agradece el apoyo financiero del MEC DGI Español (Proyecto No. CTQ2004-07768-C02-01/BQU) y Generalitat Valenciana (DGEUI INF01-051 y INFRA03-047, y OCYT GRUPOS03-173). Los autores también agradecen el apoyo financiero parcial de la “*Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología*” (CICYT) de España (Referencia del Proyecto: SAF2009-10399). Finalmente, pero no menos importante, este trabajo fue apoyado en parte por VLIR (Vlaamse InterUniversitaire Raad, Flemish Interuniversity

BIBLIOGRAFIA

1. Ando, H.; Kondoh, H.; Ichihashi, M.; Hearing, V. J. *J Invest Dermatol* **2007**, *127*, 751-61.
2. Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. *Pigment Cell Res* **2003**, *16*, 101-10.
3. Mosher, D. B.; Pathak, M. A.; Fitzpatrick, T. B. In *Update: Dermatology in General Medicine*; Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. M., Austen, K. F., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1983, p 205.
4. Maeda, K.; Fukuda, M. *J. Soc. Cosmet. Chem* **1991**, *42*, 361-368.
5. Shimizu, K.; Kondo, R.; Sakai, K.; Lee, S. H.; Sato, H. *Planta Med* **1998**, *64*, 408-12.
6. Dooley, T. P. *J. Dermatol. Treat.* **1997**, *7*, 188-200.
7. Zhu, Y. J.; Song, K. K.; Li, Z. C.; Pan, Z. Z.; Guo, Y. J.; Zhou, J. J.; Wang, Q.; Liu, B.; Chen, Q. X. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, 5518-23.
8. Zheng, Z. P.; Chen, S.; Wang, S.; Wang, X. C.; Cheng, K. W.; Wu, J. J.; Yang, D.; Wang, M. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, 6649-55.
9. Yan, Q.; Cao, R.; Yi, W.; Yu, L.; Chen, Z.; Ma, L.; Song, H. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 4055-8.
10. Mayer, A. M.; Harel, E. In *Phenoloxidasas and Their Significance in Fruit and Vegetables*; Fox, P. F., Ed.; Elsevier: London, 1991, p 373-398.
11. Parvez, S.; Kang, M.; Chung, H. S.; Cho, C.; Hong, M. C.; Shin, M. K.; Bae, H. *Phytother Res* **2006**, *20*, 921-34.

12. Lee, C. H.; Koshino, H.; Chung, M. C.; Lee, H. J.; Kho, Y. H. *J Antibiot (Tokyo)* **1995**, *48*, 1168-70.
13. Kahn, V.; Andrawis, A. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 905-908.
14. Njoo, M. D.; Westerhof, W.; Bos, J. D.; Bossuyt, P. M. *Arch. Dermatol.* **1999**, *135*, 1514-1521.
15. Rescigno, A.; Sollai, F.; Pisu, B.; Rinaldi, A.; Sanjust, E. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2002**, *17*, 207-18.
16. EEC Cosmetics Directive 84/415/EEC, s. h. w. l. c. c. v. e. p.
17. Cabanes, J.; Garcia-Canovas, F.; Tudela, J.; Lozano, J. A.; Garcia-Carmona, F. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 917-919.
18. Maeda, K.; Fukuda, M. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, *276*, 765-9.
19. Seo, S. Y.; Sharma, V. K.; Sharma, N. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 2837-53.
20. Lee, H. S. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 1400-3.
21. Lemic-Stojcevic, L.; Nias, A. H.; Breathnach, A. S. *Exp Dermatol* **1995**, *4*, 79-81.
22. Nazzaro-Porro, M. *J Am Acad Dermatol* **1987**, *17*, 1033-1041.
23. Perez-Bernal, A.; Munoz-Perez, M. A.; Camacho, F. *Am J Clin Dermatol* **2000**, *1*, 261-268.
24. Nazzaro-Porro, M.; Passi, S.; Zina, G.; Breathnach, A. S. *Acta Derm Venereol* **1989**, *143*, 49-57.
25. Parrish, F. W.; Wiley, B. J.; Simmons, E. G.; Long, L. J. *Appl. Microbiol.* **1966**, *14*, 139.
26. Chen, J. S.; Wei, C. I.; Rolle, R. S.; Otwell, W. S.; O., B. M.; Marshall, M. R. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1396-1401.
27. Goetghebeur, M.; Kermasha, S. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 935-40.
28. Espin, J. C.; Jolivet, S.; Wichers, H. J. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2976-2980.
29. Curto, E. V.; Kwong, C.; Hermersdorfer, H.; Glatt, H.; Santis, C.; Virador, V.; Hearing, V. J., Jr.; Dooley, T. P. *Biochem Pharmacol* **1999**, *57*, 663-72.
30. Kubo, I.; Kinst-Hori, I. *J Agric Food Chem* **1999**, *47*, 4121-5.
31. Chen, Q. X.; Kubo, I. *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 4108-12.
32. Ha, T. J.; Yang, M. S.; Jang, D. S.; Choi, S. U.; Park, K. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2001**, *22*, 97.
33. Badria, F. A.; elGayyar, M. A. *Boll Chim Farm* **2001**, *140*, 267-71.
34. Shahidi, L. M.; Naczk, M. *Food Phenolics*; Technomic Publishing: Lancaster, 1995.
35. Sayre, L. M.; Nadkarni, D. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3157-3158.
36. Deshpande, S. S.; Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*; Friedman, Ma, C., Eds.; Plenum: New York, 1984, p 457-495.
37. Lim, J. Y.; Ishiguro, K.; Kubo, I. *Phytother Res* **1999**, *13*, 371-5.
38. Shin, N. H.; Ryu, S. Y.; Choi, E. J.; Kang, S. H.; Chang, I. M.; Min, K. R.; Kim, Y. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *243*, 801-3.
39. Kubo, I.; Kinst-Hori, I. *J. Agric and Food Chem.* **1988**, *46*, 5338-5341.
40. Wilcox, D. E.; Porras, A. G.; Hwang, Y. T.; Lerch, K.; Winkler, M. E.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4015-4027.
41. Ullah, F.; Hussain, H.; Hussain, J.; Bukhari, I. A.; Khan, M. T.; Choudhary, M. I.; Gilani, A. H.; Ahmad, V. U. *Phytother Res* **2007**, *21*, 1076-81.
42. Efdi, M.; Ohguchi, K.; Akao, Y.; Nozawa, Y.; Koketsu, M.; Ishihara, H. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30*, 1972-4.
43. Liu, S. H.; Pan, I. H.; Chu, I. M. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30*, 1135-9.
44. Miyazawa, M.; Tamura, N. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 595-597.
45. Yoon, J. H.; Shim, J. S.; Cho, Y.; Baek, N. I.; Lee, C. W.; Kim, H. S.; Hwang, J. K. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30*, 2141-5.
46. Zheng, Z.-P.; Cheng, K.-W.; Chao, J.; Wu, J.; Wang, M. *Food Chem* **2008**, *106*, 529-535.
47. Chang, Y.-H.; Kim, C.; Jung, M.; Lim, Y.-H.; Lee, S.; Kang, S. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 719-723.
48. Karioti, A.; Protopappa, A.; Megoulas, N.; Skaltsa, H. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 2708-14.
49. Marongiu, B.; Piras, A.; Porcedda, S.; Tuveri, E.; Sanjust, E.; Meli, M.; Sollai, F.; Zucca, P.; Rescigno, A. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, 10022-7.
50. Takara, K.; Iwasaki, H.; Ujihara, K.; Wada, K. *J Oleo Sci* **2008**, *57*, 191-6.
51. Takara, K.; Otsuka, K.; Wada, K.; Iwasaki, H.; Yamashita, M. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, *71*, 183-91.
52. Ishikawa, M.; Kawase, I.; Ishii, F. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30*, 2031-6.
53. Parvez, S.; Kang, M.; Chung, H. S.; Bae, H. *Phytother Res* **2007**, *21*, 805-16.
54. Shiino, M.; Watanabe, Y.; Umezawa, K. *Bioorg Med Chem* **2001**, *9*, 1233-40.
55. Kermasha, S.; Goetghebeur, M.; Monfette, A.; Metchet, M.; Rovelt, M. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 349-353.
56. Menon, S.; Fleck, R. W.; Yong, G.; Strothkamp, K. G. *Arch Biochem Biophys* **1990**, *280*, 27-32.
57. Frankos, V. H.; Schmitt, D. F.; Haws, L. C.; McEvily, A. J.; Iyengar, R.; Miller, S. A. *Regul. Toxicol. Pharmacol* **1991**, *14*, 202-212.
58. Perez-Gilabert, M.; Garcia-Carmona, F. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *285*, 257-61.
59. Piao, L. Z.; Park, H. R.; Park, Y. K.; Lee, S. K.; Park, J. H.; Park, M. K. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2002**, *50*, 309-11.
60. Shi, Y.; Chen, Q.-X.; Wang, Q.; Song, K.-K.; Qiu, L. *Food Chem* **2005**, *92*, 707-712.
61. Jun, N.; Hong, G.; Jun, K. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 2396-402.
62. Schurink, M.; van Berkel, W. J.; Wichers, H. J.; Boeriu, C. G. *Peptides* **2007**, *28*, 485-95.
63. Huang, X.-H.; Chen, Q.-X.; Wang, Q.; Song, K.-K.; Wang, J.; Sha, L.; Guan, X. *Food Chem* **2006**, *94*, 1-6.
64. Liu, J.; Yi, W.; Wan, Y.; Ma, L.; Song, H. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 1096-102.
65. Ha, Y. M.; Chung, S. W.; Song, S.; Lee, H.; Suh, H.; Chung, H. Y. *Biol Pharm Bull* **2007**, *30*, 1711-5.
66. Criton, M.; Le Mellay-Hamon, V. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, doi:10.1016/j.ejmech.2008.04.002.
67. Lee, C. W.; Son, E. M.; Kim, H. S.; Xu, P.; Batmunkh, T.; Lee, B. J.; Koo, K. A. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 5462-4.
68. Tokiwa, Y.; Kitagawa, M.; Raku, T. *Biotechnol Lett* **2007**, *29*, 481-6.

-
69. Ahn, S. J.; Koketsu, M.; Ishihara, H.; Lee, S. M.; Ha, S. K.; Lee, K. H.; Kang, T. H.; Kima, S. Y. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2006**, *54*, 281-6.
 70. Espin, J. C.; Wichers, H. J. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1544*, 289-300.
 71. Andrawis, A.; Kahn, V. *Biochem J* **1986**, *235*, 91-6.
 72. Lovstad, R. A. *Biochem Pharmacol* **1976**, *25*, 533-5.
 73. Khan, K. M.; Saify, Z. S.; Khan, M. T. H.; Butt, N.; Maharvi, G. M.; Perveen, S.; Ambreen, N.; Choudhary, M. I.; Atta Ur, R.; Supuran, C. T. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2005**, *20*, 401-407.
 74. Kubo, I.; Chen, Q. X.; Nihei, K. I. *Food Chemistry* **2003**, *81*, 241-247.
 75. Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Kubo, Y.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T.; Haraguchi, H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 1393-1399.
 76. Li, W.; Kubo, I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 701-713.
 77. Xue, C. B.; Luo, W. C.; Ding, Q.; Liu, S. Z.; Gao, X. X. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2008**, 1-11.
 78. Xue, C. B.; Zhang, L.; Luo, W. C.; Xie, X. Y.; Jiang, L.; Xiao, T. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 2006-2015.
 79. Khatib, S.; Nerya, O.; Musa, R.; Tamir, S.; Peter, T.; Vaya, J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 2676-2681.
 80. Netzeva, T. I.; Worth, A. P.; Aldenberg, T.; Benigni, R.; Cronin, M. T. D.; Gramatica, P.; Jaworska, J. S.; Kahn, S.; Klopman, G.; Marchant, C. A.; Myatt, G.; Nikolova-Jeliazkova, N.; Patlewicz, G. Y.; Perkins, R.; Roberts, D. W.; Schultz, T. W.; Stanton, D. T.; Van De Sandt, J. J. M.; Tong, W.; Veith, G.; Yang, C. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* **2005**, *33*, 155-173.
 81. Li, W.; Kubo, I. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 701-13.
 82. Khan, K. M.; Maharvi, G. M.; Khan, M. T. H.; Perveen, S.; Choudhary, M. I.; Rahman, A.-u. *Molecular Diversity* **2005**, *9*, 15-26.
 83. Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Han, C.; Yoon, J.; Kim, N.; Seo, J.; Lee, C. *J Agric Food Chem* **2006**, *54*, 935-41.
 84. Matoba, Y.; Kumagai, T.; Yamamoto, A.; Yoshitsu, H.; Sugiyama, M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8981-90.
 85. Schweikardt, T.; Olivares, C.; Solano, F.; Jaenicke, E.; Garcia-Borrón, J. C.; Decker, H. *Pigment Cell Res* **2007**, *20*, 394-401.
 86. Xue, C.-B.; Luo, W.-C.; Ding, Q.; Liu, S.-Z.; Gao, X.-X. *J Comput Aided Mol Des* **2008**, *22*, 299-309.
 87. Xue, C. B.; Zhang, L.; Luo, W. C.; Xie, X. Y.; Jiang, L.; Xiao, T. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 2006-15.
 88. Pasha, F. A.; Muddassar, M.; Beg, Y.; Cho, S. J. *Chem Biol Drug Des* **2008**, *71*, 483-93.
 89. Yan, Q.; Cao, R.; Yi, W.; Chen, Z.; Wen, H.; Ma, L.; Song, H. *Eur J Med Chem* **2009**, *44*, 4235-43.
 90. Yamazaki, Y.; Kawano, Y.; Yamanaka, A.; Maruyama, S. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 4178-82.
 91. Noh, J. M.; Kwak, S. Y.; Seo, H. S.; Seo, J. H.; Kim, B. G.; Lee, Y. S. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 5586-9.
 92. Ng, L. T.; Ko, H. H.; Lu, T. M. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 4360-6.
 93. Chang, T. S. *Int J Mol Sci* **2009**, *10*, 2440-75.