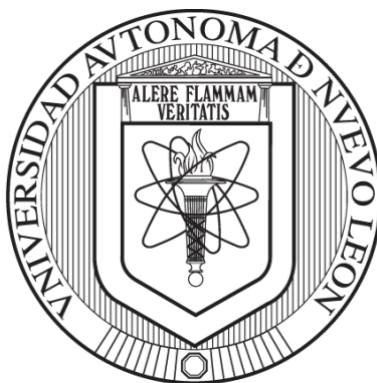


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIVENEJECIMIENTO DE EXTRACTOS DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE *Tamarindus indica*
CON FINES DERMATOLÓGICOS**

Por

Q.B.P. JOCELYN MAYRET ARREDONDO OLIVAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

2026

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIENVEJECIMIENTO DE EXTRACTOS DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE *Tamarindus indica*
CON FINES DERMATOLÓGICOS**

Aprobación de la Tesis:

Dra. María del Rosario González González
Presidenta

Secretario

Vocal

Subdirección de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIENTEJECIMIENTO DE EXTRACTOS DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE *Tamarindus indica*
CON FINES DERMATOLÓGICOS**

Revisión de la tesis:

Dra. María del Rosario González González
Directora de Tesis

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Codirectora de Tesis

Dr. Omar González Santiago
Comité Tutorial

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Comité Tutorial

Dra. Patricia González Barranco
Comité Tutorial

Subdirección de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Q.B.P. Jocelyn Mayret Arredondo Olivas

Fecha de Graduación: marzo, 2025

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Ciencias Químicas.

Título del Estudio: EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIENVEJECIMIENTO DE EXTRACTOS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE *Tamarindus indica* CON FINES DERMATOLÓGICOS.

Número de páginas: 63

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia

Área de Estudio: Farmacología de productos naturales.

Propósito y Método del Estudio: El envejecimiento cutáneo es un proceso asociado al incremento del estrés oxidativo y a la degradación de la matriz extracelular por acción enzimática. Diversos compuestos fenólicos de origen natural han demostrado capacidad para modular estos mecanismos mediante actividad antioxidante e inhibición enzimática, orientando el interés hacia los residuos agroindustriales como fuente sustentable de moléculas bioactivas. En este contexto, se evaluó el extracto etanólico de tegumento de semillas y el extracto etanólico de cáscaras de *Tamarindus indica*, determinando su actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH, el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, la capacidad inhibitoria sobre elastasa y hialuronidasa mediante ensayos de fluorescencia y turbidimetría, respectivamente, y su efecto citotóxico en fibroblastos humanos a través del ensayo MTT.

Contribuciones y Conclusiones: Los resultados confirmaron la hipótesis propuesta, ya que ambos extractos presentaron compuestos fenólicos, actividad antioxidante e inhibición de elastasa y hialuronidasa bajo las condiciones experimentales evaluadas, sin evidenciar citotoxicidad en fibroblastos humanos MRC-5 en el rango de concentraciones de 0.1–0.83 mg/mL. El extracto de tegumento registró valores superiores en capacidad antioxidante e inhibición enzimática en comparación con estándares de referencia y el extracto de cáscara, aunque este último también presentó actividad dentro del intervalo estudiado. Los hallazgos aportan evidencia de actividad antienvjecimiento *in vitro* y promueven el aprovechamiento de estos residuos agroindustriales en el ámbito farmacéutico dermatológico.

Firma del asesor:

Dra. María del Rosario González González

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Rosario González González**, por brindarme la oportunidad de integrarme como su tesista y por la confianza depositada en mí. Su dirección, asesoría, consejos y respaldo fueron fundamentales para consolidar este proyecto.

Dr. Omar González Santiago, por sus enseñanzas, empatía y disposición para orientar cada etapa de este posgrado. Su acompañamiento académico y calidad humana hicieron posible la conclusión de esta etapa.

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas, por su guía, apoyo, paciencia y dedicación al compartir sus conocimientos. Sus consejos, tanto académicos como personales, marcaron profundamente mi desarrollo en este posgrado. Mi gratitud trasciende lo académico.

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez, Dra. María del Rayo Camacho Corona, Dra. Patricia González Barranco, por sus valiosas observaciones, tiempo y recomendaciones que permitieron consolidar este trabajo de investigación.

Dr. Alonso Alberto Orozco, por abrirme las puertas en su laboratorio y acompañarme en cada etapa experimental; por compartir su experiencia, conocimientos y motivarme a superar mis propios límites. Las enseñanzas y amistad derivada de esta colaboración me acompañarán siempre.

Dra. Dianelys Sotolongo Rodriguez por las palabras de aliento, amistad y consejos invaluables.

Lic. Enriqueta Monreal Cuevas, por su colaboración y guía en cultivo celular.

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, a la **Dra. María Elena Cantú Cárdenas** y al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías**, por permitirme el uso de sus instalaciones y el otorgamiento de la beca de posgrado que me permitió dedicarme de tiempo completo a esta investigación.

A mis compañeros **Diana González** y **Leonardo Núñez**, por su amistad y tiempo compartido a lo largo del posgrado, un privilegio haber coincidido.

A **mis padres**, este trabajo es suyo también; lo que hoy soy profesionalmente es un reflejo de los valores y la educación que me inculcaron.

Alejandro Delgado, por acompañarme durante esta etapa con paciencia, empatía y cariño; escuchar cada preocupación, celebrar cada avance y sostenerme en los momentos más difíciles.

Finalmente, agradezco a todos los doctores que como docentes contribuyeron a mi formación. Este trabajo representa no solo un esfuerzo académico, sino una etapa de crecimiento personal que no habría sido posible sin cada uno de ustedes.

DEDICATORIA

A mi padre, cuyo ejemplo y apoyo incondicional siempre guían mis pasos.

A mi hermana, que construye su camino y me acompaña en el mío.

*A mi madre, por creer en mí incluso cuando yo dudaba; en ella comienza todo
lo que soy y todo lo que he logrado.*

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de la piel.....	1
1.2 Envejecimiento	2
1.3 Envejecimiento cutáneo	3
1.3.1 Importancia clínica del envejecimiento cutáneo	3
1.3.2 Factores intrínsecos y extrínsecos	3
1.4 Enzimas degradantes de la MEC.....	4
1.5 Productos naturales para contrarrestar signos de envejecimiento	6
1.6 Residuos agroindustriales	7
1.6.1 Residuos de tamarindo en México	8
1.7 <i>Tamarindus indica</i>	9
2. ANTECEDENTES.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos específicos.....	17
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	18
6.1 Equipos.....	18
6.2 Preparación de extractos etanólicos de <i>T. indica</i>	20
6.3 Determinación de actividad antioxidante de los extractos.....	21
6.4 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	23
6.5 Determinación de actividad anti-elastasa	26
6.6 Determinación de actividad anti-hialuronidasa	27
6.7 Evaluación <i>in vitro</i> de citotoxicidad	29
6.7.1 Cultivo celular	29
6.7.2 Ensayo de citotoxicidad.....	30
6.8 Manejo y disposición de residuos	33

7. RESULTADOS.....	34
7.1 Extractos etanólicos de <i>T. indica</i>	34
7.1.1 Extracto etanólico de tegumento de semillas.....	34
7.1.2 Extracto etanólico de cáscaras.....	35
7.2 Actividad antioxidante.....	35
7.3 Contenido fenólico total.....	38
7.4 Actividad anti-elastasa.....	39
7.5 Actividad anti-hialuronidasa	40
5.5 Citotoxicidad en cultivo celular	41
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
9. CONCLUSIONES	49
10. PERSPECTIVAS	51
REFERENCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Reacción ensayo DPPH	22
2. Reacción ensayo Folin-Ciocalteu	24
3. Reacción ensayo MTT	30
4. Extracto obtenido a partir de tegumento de semillas de tamarindo	34
5. Extracto obtenido a partir de cáscara de tamarindo	35
6. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH por extractos de <i>T. indica</i>	36
7. Curva de calibración de ácido gálico.....	38
8. Células de fibroblastos de pulmón humanas MCR-5.....	42
9. Viabilidad celular (MTT).....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Capacidad antioxidante (DPPH) de extractos de <i>T. indica</i>	37
2. Contenido fenólico total de extractos de <i>T. indica</i>	39
3. Resultados inhibición de elastasa	40
4. Resultados inhibición de hialuronidasa	41
5. Citotoxicidad en fibroblastos humanos MRC-5	42

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
EC ₅₀	Concentración Efectiva Media
EMEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
HA	Ácido Hialurónico
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinasas de Matriz Extracelular
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)
PBS	Buffer Fosfato Salino
RE	Rutina Equivalentes
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SFB	Suero Fetal Bovino
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la piel

La piel, como el órgano más grande del cuerpo humano, desempeña varias funciones esenciales para mantener la salud general y la homeostasis. Actúa como una barrera física, química e inmunológica frente al ambiente externo, protegiendo los tejidos y órganos internos de lesiones mecánicas, infecciones microbianas y radiación ultravioleta ¹⁻⁴. Es un componente clave del sistema inmunológico, ya que alberga células inmunitarias que colaboran en la eliminación de patógenos, y en la regeneración de tejidos dañados, funciones esenciales para la cicatrización y la prevención de inflamaciones crónicas y tumores ^{4,5}.

La piel también regula la temperatura corporal mediante la sudoración y la dilatación o constricción de los vasos sanguíneos ^{1,6}, y controla la hidratación, gracias a las acuaporinas, que facilitan el transporte de agua a través de las membranas celulares¹. Participa en la síntesis de vitamina D, necesaria para la salud ósea⁷. Además, alberga un microbioma diverso que protege contra microorganismos patógenos contribuyendo a la función de barrera ^{2,3}.

Sin embargo, con el paso del tiempo, la piel, al igual que otros órganos del cuerpo, está sujeta a un proceso natural de envejecimiento, asociado a la acumulación de daño celular y molecular, lo que limita progresivamente sus funciones fisiológicas, incluida la protección, la regeneración y la respuesta frente a agentes externos ⁸.

1.2 Envejecimiento

El envejecimiento, desde un punto de vista biológico, constituye un proceso complejo que se manifiesta a nivel celular y molecular, se define como una pérdida progresiva de la integridad fisiológica, lo que conduce a una función deteriorada de los órganos y una mayor vulnerabilidad a la mortalidad de manera exponencial ⁹. Este proceso involucra múltiples vías biológicas conectadas entre sí, las cuales se clasifican en factores intrínsecos, principalmente determinados por factores genéticos y biológicos, mientras que los factores extrínsecos son provocados por la exposición a diversas condiciones ambientales y el estilo de vida. Estos factores tienen diversos mecanismos que incluyen la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células madre y la comunicación intercelular alterada, causando afecciones en los órganos, incluida la piel ^{10,11}.

1.3 Envejecimiento cutáneo

1.3.1 Importancia clínica del envejecimiento cutáneo

La piel envejecida presenta una mayor vulnerabilidad en su función de barrera y en su respuesta inmunológica, lo que incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cutáneas graves, como el cáncer.¹². Además, el envejecimiento cutáneo, al manifestarse con cambios visibles en la apariencia de la piel y siendo un órgano externo, puede tener un impacto psicológico en las personas. Las alteraciones en la piel pueden influir en la percepción de la propia imagen y, por ende, en la autoestima y confianza de los individuos¹³.

1.3.2 Factores intrínsecos y extrínsecos

Tanto los factores intrínsecos como los extrínsecos juegan un papel importante en el proceso de envejecimiento de la piel. Entre los factores intrínsecos más importantes se encuentra el acortamiento de los telómeros. Los telómeros son estructuras protectoras en los extremos de los cromosomas que se acortan con cada división celular. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, las células entran en un estado de senescencia. Las células senescentes se acumulan en la piel y contribuyen al proceso de envejecimiento al secretar citocinas proinflamatorias, que pueden dañar la estructura de la piel^{14,15}.

Otro factor intrínseco relevante es el estrés oxidativo endógeno, que se produce por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el metabolismo celular. A lo largo del tiempo, la acumulación de ROS daña componentes celulares como el ADN, las proteínas y los lípidos, lo que compromete las funciones celulares y acelera el envejecimiento ^{14,16}.

En cuanto a los factores extrínsecos, la contaminación ambiental, ocasionada por diversos compuestos tales como las partículas en suspensión y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, también acelera el envejecimiento cutáneo al generar ROS y desencadenar respuestas inflamatorias. Estos contaminantes pueden atravesar la barrera cutánea y causar estrés oxidativo^{16,17}.

La radiación ultravioleta (UV) es uno de los factores extrínsecos más destacados, y su efecto se denomina foto-envejecimiento. La exposición a la radiación UV genera ROS, que causan daños directos al ADN y activan vías de señalización que resultan en la sobreexpresión de enzimas que degradan la matriz extracelular (MEC) ¹⁸.

1.4 Enzimas degradantes de la MEC

El envejecimiento cutáneo está estrechamente relacionado con la sobreproducción de enzimas como la colagenasa, la elastasa y la hialuronidasa, las cuales producen los signos visibles del envejecimiento. La colagenasa es una metaloproteínasa de matriz (MMP) involucrada en la

degradación de las fibras de colágeno, uno de los principales componentes estructurales de la matriz extracelular dérmica. En la piel envejecida se ha observado un aumento en la expresión y actividad de diversas MMPs, lo que conduce a la fragmentación del colágeno y a la alteración de la arquitectura dérmica^{19,20}. Este deterioro estructural no ocurre de forma aislada, sino que favorece un microambiente que potencia la actividad de otras enzimas proteolíticas, como la elastasa, amplificando el daño sobre los componentes de soporte de la piel. Asimismo, la fragmentación del colágeno altera la interacción fibroblasto–matriz extracelular, afectando la funcionalidad de los fibroblastos y reduciendo la síntesis de nuevas fibras estructurales²⁰. De manera complementaria, la elastasa es la enzima responsable de la degradación de las fibras de elastina, las cuales son esenciales para mantener la elasticidad y la capacidad de la piel para recuperar su forma original tras el estiramiento. El aumento de la actividad de la elastasa en la piel envejecida contribuye directamente a la pérdida de elasticidad y a la formación de arrugas^{21,22}. Por su parte, la hialuronidasa degrada el ácido hialurónico (HA), un componente fundamental para la hidratación y la firmeza cutánea. La disminución del HA como consecuencia de una mayor actividad de la hialuronidasa se traduce en una piel más seca, menos elástica y más susceptible al daño. Además, la exposición a factores externos, como la radiación ultravioleta, puede incrementar la actividad de esta enzima, exacerbando los efectos asociados al envejecimiento cutáneo^{21,22}.

En conjunto, la acción de estas enzimas conduce a una alteración progresiva de la matriz extracelular, comprometiendo la integridad estructural, la elasticidad y la hidratación de la piel. En este contexto, la inhibición enzimática representa una estrategia relevante para contrarrestar el envejecimiento cutáneo. Diversos tratamientos y productos tópicos buscan inhibir principalmente enzimas como la elastasa y la hialuronidasa, debido a su papel directo en la pérdida de la estructura y función de la dermis.²³

1.5 Productos naturales para contrarrestar signos de envejecimiento

La administración de productos naturales, especialmente botánicos, para mejorar o eliminar los signos indeseables de la piel envejecida se ha utilizado durante mucho tiempo²⁴. Los polifenoles, que son compuestos que contienen grupos hidroxilo unidos a átomos de carbono de anillos aromáticos, son el grupo más grande y estudiado de metabolitos secundarios de plantas con propiedades antioxidantes conocidas. Se pueden clasificar como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y otros polifenoles²⁵. Recientemente se ha reportado que la aplicación tópica o ingesta oral de algunas plantas ricas en polifenoles puede prevenir o reducir condiciones indeseables de envejecimiento cutáneo^{26,27}.

Estos compuestos pueden regular las vías de señalización relacionadas con el envejecimiento celular y la senescencia, retrasando la aparición de arrugas y mejorando la elasticidad de la piel ²⁸.

Los polifenoles tienen la capacidad de unirse directamente a las MMP, inhibiendo así su actividad enzimática ²⁹; además, sus grupos hidroxilo actúan como quelantes de iones metálicos inhibiendo las ROS y brindando protección a la piel contra los rayos UV ^{28,30}. En este contexto, las formulaciones a partir extractos de origen vegetal han cobrado relevancia por su perfil de seguridad y sus múltiples mecanismos de acción ^{31,32}.

1.6 Residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales son materiales sobrantes, partes no comestibles de frutas y verduras. Esto incluye, cáscaras, semillas, tallos, hojas y otros subproductos. Estos residuos a menudo son considerados desechos por la industria de alimentos y su volumen aumenta anualmente por la alta demanda de productos alimenticios. Aprovechar estos desechos añadirá valor a la cadena de suministro y simplificará los procesos de gestión de residuos al reducir los costos de tratamiento y eliminación ^{33,34}.

1.6.1 Residuos de tamarindo en México

México es el octavo productor de tamarindo a nivel mundial, representando el 4.05 % de la producción en 2022, con más de 54,000 toneladas, según lo reportado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en 2023 ³⁵.

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco reportó en enero de 2021 que, durante las etapas de postcosecha y transformación, se generan pérdidas significativas de productos alimenticios y residuos, las cuales pueden representar hasta el 40 % del volumen procesado. Estas pérdidas se asocian principalmente a factores como el deterioro natural de los alimentos por factores ambientales y microbiológicos, daños mecánicos durante la manipulación y el transporte, prácticas inadecuadas de almacenamiento, así como a los procesos de selección, procesamiento y extracción industrial, en los que se descartan subproductos que no cumplen con los estándares comerciales ³⁶.

Dichos residuos representan una cantidad disponible equivalente a varias toneladas anuales, las cuales constituyen una fuente potencialmente valiosa que podría aprovecharse para la obtención de biomoléculas. ³⁷.

1.7 *Tamarindus indica*

Comúnmente conocido como tamarindo, es un árbol tropical perteneciente a la familia de las leguminosas (Fabaceae, subfamilia Caesalpinioideae); presenta hojas compuestas y flores con tonalidades rojizas. Sus frutos, vainas marrones y duras, contienen una pulpa ácida y dulce, rodeando semillas brillantes. Esta especie botánica se distribuye principalmente en regiones tropicales y subtropicales de África, América y Asia, siendo nativa del este de África ³⁸.

Estudios científicos previos han destacado los compuestos químicos presentes en el tamarindo, especialmente ácidos orgánicos como el ácido tartárico, cítrico y málico, así como polifenoles; los cuales han sido objeto de investigación por sus posibles efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos, entre otros posibles beneficios para la salud ³⁹⁻⁴¹.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

A continuación, se describen algunos de los estudios, los cuales han utilizado extractos de *T. indica* a través de los años.

En el año 2009, Lourith y colaboradores realizaron una comparación de la actividad captadora de radicales libres y el contenido total de fenoles de extractos de la cubierta de semilla de tamarindo obtenidos mediante partición y maceración. La cáscara de semilla de tamarindo fue suspendida en alcohol etílico al 70 % y luego particionada con cloruro de metileno y acetato de etilo respectivamente. La actividad antioxidante resultó ser notablemente mayor que la del ácido ascórbico y el butilhidroxitolueno (BHT), utilizados como controles positivos, demostrando un potencial para su aplicación en productos cosméticos y farmacológicos ⁴².

En 2013, Lim y colaboradores llevaron a cabo un estudio *in vitro* que demostró que la pulpa de fruta de *T. indica* contenía cantidades significativas de fenoles (244.9 ± 10.1 mg GAE/g de extracto) y flavonoides (93.9 ± 2.6 mg RE/g de extracto). La administración de la pulpa de *T. indica* a hámsters con hipercolesterolemia tuvo un efecto protector contra el daño oxidativo al aumentar las enzimas antioxidantes hepáticas y prevenir la oxidación lipídica hepática. ⁴³.

En 2014, Phetdee y colaboradores evaluaron la capacidad antioxidante de un extracto alcohólico obtenido de la cubierta de la semilla de tamarindo el cual presentó una mayor eficacia para neutralizar radicales libres (ensayo DPPH, EC_{50} = 12.9 $\mu\text{g/mL}$) en comparación con antioxidantes de referencia como ácido L-ascórbico (EC_{50} = 22.9 $\mu\text{g/mL}$) y alfa-tocoferol (EC_{50} = 29.3 $\mu\text{g/mL}$). En fibroblastos de piel humana cultivados, la exposición a peróxido de hidrógeno (100–1000 μM) provocó una disminución de la viabilidad celular del 62 al 92 % de las células, en contraste, esta se atenuó a 35-47 % cuando las células fueron preincubadas con el extracto (200 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas. Asimismo, la irradiación UVA (40 J/cm^2) causó muerte celular a un 25 % de los fibroblastos, mientras que dicho efecto se redujo al 10 % con el uso del extracto ⁴⁴.

Ese mismo año, Sandesh y colaboradores reportaron que el extracto metanólico de la cubierta de la semilla de *T. indica* muestra la presencia de compuestos responsables de exhibir estas actividades antioxidantes, mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*. Además de proporcionar un efecto hepatoprotector contra la toxicidad de CCl_4 ⁴⁵.

De igual manera, en 2014, Nakchat y colaboradores evaluaron cómo actúa el extracto etanólico de la cubierta de la semilla de *T. indica* en fibroblastos dérmicos humanos sometidos a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los autores reportaron una disminución significativa de las especies reactivas de oxígeno (ROS) asociado al incremento de los niveles de glutatión reducido y la expresión de enzimas antioxidantes clave, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa ⁴⁶.

En 2017, Waqas y colaboradores desarrollaron una emulsión agua/aceite con extracto de semillas de *T. indica*, la cual presentó actividad antioxidante *in vitro* frente a radicales DPPH, óxido nítrico, hidroxilo y superóxido. Tras 12 semanas de aplicación en voluntarios sanos, la formulación redujo significativamente los parámetros de superficie cutánea asociados con el envejecimiento como escamosidad, arrugas, textura y rugosidad. En contraste, la base sin extracto usada como control, no produjo cambios significativos.⁴⁷

En 2019, Martins *et al.* y Komakech *et al.* publicaron estudios de revisión en los que se analizó el potencial bioactivo de diferentes subproductos de *T. indica*; se registraron compuestos como fenoles, ácidos grasos y polisacáridos, cuya recuperación mediante técnicas de extracción adecuadas presentan actividad antioxidante, protectora frente al estrés oxidativo, entre otras funciones biológicas de utilidad en formulaciones farmacéuticas.^{48,49}

En 2022, Sookying y colaboradores, reportaron que, a través de varios estudios se encontró que los extractos de hojas de *T. indica* contienen flavonoides y ácidos fenólicos como catequina, vitexina, orientina, apigenina y luteolina, conocidos por ser potentes antioxidantes, además de haber presentado una baja toxicidad en pruebas de cultivo celular y animales⁵⁰.

En 2023, Wandee y colaboradores reportaron un alto contenido de catequina como constituyente químico y múltiples bioactividades beneficiosas anti-melanogénicas y quelantes al evaluar fracciones obtenidas mediante distintos procesos de extracción a partir de la semilla y la pulpa de *T. indica* incluida una respuesta anti-oxidación superior al ácido ascórbico y la catequina utilizadas como controles⁵¹.

En 2023, Weixi y colaboradores elaboraron un extracto de cáscaras de tamarindo, el cual confirmó su alto contenido de flavonoides y una fuerte actividad de eliminación de radicales libres *in vitro*. Además, disminuyó significativamente los niveles de ROS, revelando resultados contra el daño oxidativo en células cancerígenas ⁵².

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento ha sido una preocupación constante a lo largo de la historia de la humanidad, debido a que al envejecer los órganos internos comienzan a mostrar signos de deterioro; sin embargo, los efectos más evidentes se observan en la piel, el órgano más expuesto a factores externos e internos que aceleran este proceso. Esta situación ha generado una creciente demanda de productos que combatan los signos visibles del envejecimiento.

Con base en los antecedentes, podría considerarse que el proceso de envejecimiento cutáneo es un fenómeno complejo influenciado por factores intrínsecos y extrínsecos, como la radiación ultravioleta, la contaminación y el estrés oxidativo. Estos factores generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan daño a las estructuras celulares y aumentan las enzimas responsables de alterar la integridad y funcionalidad de la piel.

Los productos naturales han sido ampliamente investigados por su alto contenido de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, los cuales han demostrado efectos protectores y regenerativos sobre la piel. En este contexto, se propone el estudio de extractos de *T. indica*, planta originaria de regiones tropicales y subtropicales, cuyo fruto —el tamarindo— posee gran relevancia en la industria alimentaria en México.

No obstante, una parte considerable del fruto, como la cáscara y las semillas, se descarta como residuo agroindustrial. El aprovechamiento de estos residuos como fuente de moléculas bioactivas representa una alternativa innovadora y sustentable.

El presente estudio busca evaluar la actividad antienvjecimiento de los extractos etanólicos obtenidos a partir de los residuos de cáscaras y tegumento de las semillas del tamarindo. Al enfocar el análisis en la capacidad antioxidante de estos extractos, su actividad inhibitoria de enzimas degradantes de la MEC y su baja citotoxicidad, se pretende aportar evidencia científica que respalde su uso en productos dermatológicos, de esta manera, se busca no solo validar su potencial bioactivo, sino también contribuir al aprovechamiento integral de residuos agroindustriales.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de residuos agroindustriales de *T. indica* presentan actividad antienvjecimiento *in vitro*, evaluada mediante la cuantificación de compuestos fenólicos, efecto antioxidante, inhibición de elastasa, inhibición de hialuronidasa y nula citotoxicidad en fibroblastos humanos.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antienvjecimiento *in vitro* de extractos etanólicos obtenidos a partir de residuos agroindustriales de *T. indica*, con fines dermatológicos.

5.2 Objetivos específicos

- I. Preparar extracto etanólico de cáscaras de *T. indica*
- II. Preparar extracto etanólico de tegumento de semillas de *T. indica*
- III. Determinar actividad antioxidante de cada extracto
- IV. Cuantificar compuestos fenólicos
- V. Determinar actividad anti-elastasa de cada extracto
- VI. Determinar actividad anti-hialuronidasa de cada extracto
- VII. Evaluar citotoxicidad en cultivo celular

CAPÍTULO 6

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Equipos

Las actividades experimentales del presente proyecto se realizaron en la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en el Laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), así como en el Laboratorio de Productos Naturales y el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos, ubicados en la FCQ División de Estudios de Posgrado, y en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Unidad de Formulación de Biológicos del Departamento de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB).

A continuación, se presentan los equipos empleados y el laboratorio correspondiente.

Laboratorio de Farmacobiología

· FCQ-UANL

Balanza analítica, estufa,
mezclador-agitador de propela.

Laboratorio de Productos Naturales

· FCQ-UANL

Evaporador rotativo.

Laboratorio de Farmacología Molecular

· FCQ-UANL

Lector de microplacas de
fluorescencia.

Laboratorio de Inmunología y Virología

· FCB-UANL

Lector de microplacas, sonicador,
incubadora de cultivo celular,
campana de flujo laminar,
microscopio invertido.

6.2 Preparación de extractos etanólicos de *T. indica*

Se realizó una adaptación del método reportado por Wandee *et al.* (2022). Las cáscaras y semillas de *T. indica* se lavaron con agua destilada y se secaron en estufa a 40 °C durante 24 h.

El extracto 1, compuesto por tegumento de semillas de tamarindo, se obtuvo mediante maceración de las semillas en etanol grado analítico en proporción 1:5 (p/v) durante 24 h. Posteriormente, las semillas se retiraron y el tegumento se separó mecánicamente. El tegumento se sometió a una segunda maceración en etanol grado analítico durante 48 h. El filtrado se recolectó utilizando papel filtro Whatman® No. 1 y se concentró mediante evaporación rotatoria a 45 °C hasta su secado.

El extracto 2, compuesto por cáscaras de tamarindo, se obtuvo mediante trituración del material vegetal, seguida de maceración en etanol grado analítico en proporción 1:5 (p/v) durante 72 h. El filtrado se recolectó utilizando papel filtro Whatman® No. 1 y se concentró mediante evaporación rotatoria a 45 °C hasta su secado.

Finalmente, ambos extractos se almacenaron a -20 °C hasta su utilización en los experimentos posteriores.

El porcentaje de rendimiento de cada extracto se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{M_{\text{extracto}}}{M_{\text{materia prima}}} \times 100$$

donde:

M_{extracto} corresponde a la cantidad de extracto expresada en gramos y $M_{\text{materia prima}}$ corresponde a la cantidad de tegumento de semillas o cáscaras de *T. indica* empleado en la elaboración del extracto, expresada en gramos.

6.3 Determinación de actividad antioxidante de los extractos

La actividad antioxidante de los extractos de *T. indica* se determinó mediante el ensayo de reducción del radical libre DPPH (*1,1-difenil-2-picrilhidrazil*); se empleó ácido ascórbico como estándar de referencia ⁵¹.

El fundamento de este método se basa en la capacidad de los antioxidantes para donar electrones a los radicales libres, lo que resulta en la neutralización de su actividad dañina. El DPPH es un radical libre estable con un color violeta intenso en solución. Cuando se agrega un antioxidante al DPPH, este último radical acepta un electrón del antioxidante, lo que produce una reducción en el DPPH y cambia su color de violeta a amarillo pálido (Figura 1) ⁵³.

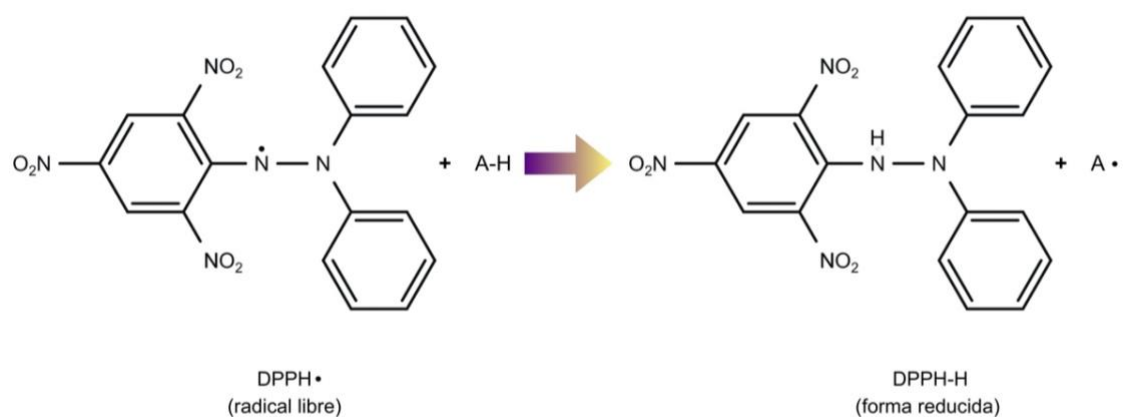


Figura 1. Reacción de reducción del radical DPPH• (*2,2-difenil-1-picrilhidrazilo*) por antioxidantes (A-H).

Se prepararon soluciones de trabajo de cada extracto en metanol para obtener un rango de concentración final de 0–25 µg/mL. De manera simultánea, se prepararon soluciones de ácido ascórbico en el mismo rango de concentración, las cuales fueron utilizadas como referencia comparativa. Se preparó una solución de DPPH 0.2 mM en metanol. La reacción se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 150 µL de la solución de muestra o del estándar y 50 µL de la solución de DPPH, obteniendo un volumen final de 200 µL. Como control negativo se utilizó DPPH con metanol, y como blanco se empleó metanol, así como control de color para cada extracto. La microplaca se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas. El procedimiento experimental se realizó por triplicado.

El porcentaje de reducción del radical DPPH se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción DPPH} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

donde:

A_{control} corresponde a la absorbancia de la solución de DPPH y, A_{muestra} corresponde a la absorbancia de la mezcla de reacción que contiene extracto de *T. indica* o el ácido ascórbico.

Los datos obtenidos se graficaron trazando la concentración frente al porcentaje de reducción del radical DPPH, comparando la actividad antioxidante de los extractos con la del estándar de referencia.

6.4 Cuantificación de compuestos fenólicos

El contenido fenólico total de los extractos de *T. indica* se determinó espectrofotométricamente mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se empleó ácido gálico como estándar fenólico de referencia.

El fundamento de este método se basa en la reducción del reactivo (mezcla de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico) en medio básico, produciendo un cambio de coloración de amarillo pálido a azul proporcional a la concentración de fenoles presentes en la muestra (Figura 2) ⁵⁴.

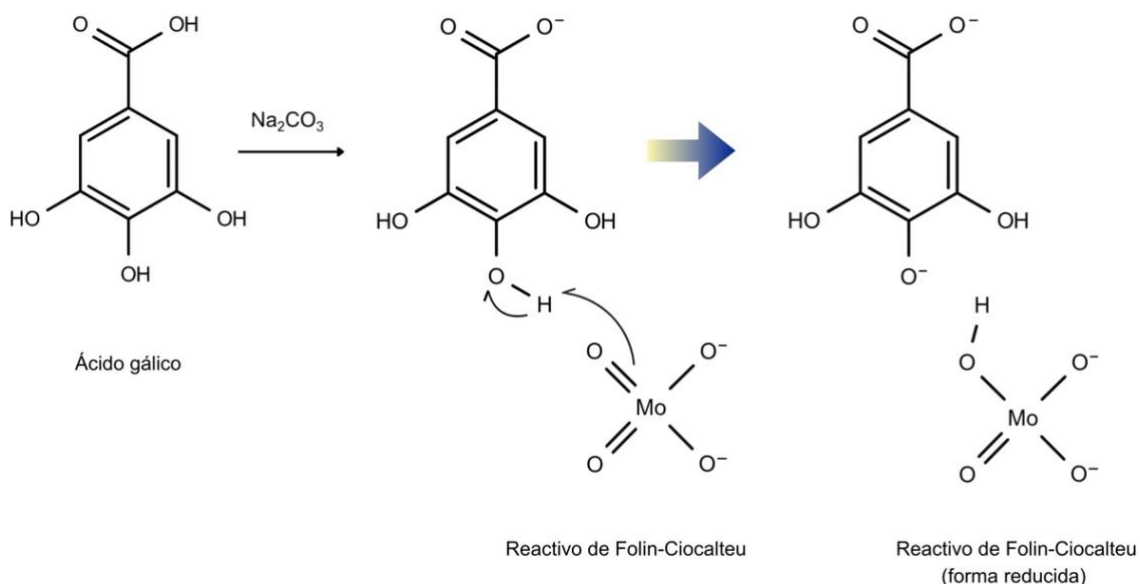


Figura 2. Reacción del ensayo de Folin–Ciocalteu, basada en la reducción de los derivados aniónicos de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico por ácido gálico.

Se prepararon soluciones de trabajo de cada extracto en agua destilada para obtener una concentración final de 12.5 µg/mL. De manera simultánea, se prepararon soluciones de trabajo de ácido gálico en agua destilada en un rango de 0–100 µg/mL, utilizadas para la construcción de la curva de calibración. Se preparó una solución acuosa de carbonato de sodio al 20 % (p/v) y se utilizó reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. La reacción se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 50 µL de la solución de muestra o estándar, 25 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N) y 125 µL de carbonato de sodio al 20 % (p/v), obteniéndose un volumen final de 200 µL por pocillo.

Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción conteniendo todos los reactivos, excepto la solución de ácido gálico o muestra, y como blanco se empleó agua destilada.

La microplaca se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después, se midió la absorbancia a 700 nm utilizando un lector de microplacas, para posteriormente obtener una ecuación lineal ($y = ax + b$) y un coeficiente de regresión (R^2) con las absorbancias. El procedimiento experimental se realizó por triplicado.

Posteriormente, el contenido fenólico total de los extractos se calculó utilizando la ecuación derivada de la curva de calibración del ácido gálico y se expresó en mg de equivalente de ácido gálico por gramo de extracto muestra (mg GAE/g).

El contenido fenólico total de los extractos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido fenólico total} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{\text{pendiente} \times M}$$

donde:

A_{muestra} corresponde a la absorbancia de la solución de la muestra; A_{blanco} corresponde a la absorbancia de la solución blanco; pendiente corresponde al valor a obtenido de la ecuación lineal ($y = ax + b$) derivada de la curva de calibración de ácido gálico; y M corresponde a la cantidad de extracto de *T. indica* empleada en el ensayo, expresada en gramos.⁵¹

6.5 Determinación de actividad anti-elastasa

La actividad inhibitoria de la elastasa por parte de los extractos se determinó mediante el ensayo fluorimétrico *EnzCheck Elastase Inhibitor Screening Assay* (Thermo Fisher Scientific), acorde al protocolo del fabricante.

La actividad de la elastasa se evaluó a partir de la hidrólisis del sustrato fluorescente DQ elastina. Este sustrato se encuentra inicialmente en estado apagado (Quenched) y, al ser degradado por la elastasa, libera fragmentos fluorescentes cuya intensidad es proporcional a la acción enzimática ⁵⁵.

Se preparó una solución trabajo de sustrato (elastina) en buffer Tris-HCL a una concentración de 100 µg/mL. Posteriormente, se preparó la solución de elastasa pancreática porcina (Sigma-Aldrich) en buffer Tris-HCl a una concentración final en microplaca de 0.4 U/mL.

Las soluciones de muestra, correspondientes a los extractos de *T. indica*, se disolvieron en una mezcla de DMSO al 1 % (v/v) y buffer Tris-HCL, obteniéndose soluciones stock a una concentración de 1 mg/mL. A partir de estas, se prepararon diluciones seriadas en microplaca para alcanzar concentraciones finales comprendidas entre 0.001 y 100 µg/mL.

Se realizó una pre-incubación de 50 µL de las diferentes diluciones de cada extracto con 100 µL de la enzima durante 15 minutos, seguida de la adición del sustrato (50 µL). La intensidad de fluorescencia se midió en un lector de microplacas de fluorescencia (λ_{ex} 505 nm, λ_{em} 515 nm). La resta de la fluorescencia de fondo se realizó mediante pozos con mezcla de reacción sin enzima. Se utilizó *N-Metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-clorometil-cetona*, inhibidor

específico de elastasa proporcionado por el fabricante como control positivo evaluado en el mismo intervalo de concentraciones que los extractos ^{56,57}. El procedimiento experimental se realizó por triplicado.

El porcentaje de inhibición de elastasa por los extractos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición elastasa} = \left(\frac{1 - S}{C} \right) \times 100$$

donde:

S corresponde a la fluorescencia corregida de las muestras de extracto y C corresponde a la fluorescencia corregida del control sin enzima. ⁵⁸.

6.6 Determinación de actividad anti-hialuronidasa

La actividad inhibitoria de la hialuronidasa por parte de los extractos se determinó mediante el ensayo turbidimétrico *QuantiChrom Hyaluronidase Inhibitor Screening Assay* (BioAssay Systems), acorde al protocolo del fabricante. La actividad de la hialuronidasa se evaluó a partir de la turbidez generada por la precipitación del ácido hialurónico no hidrolizado ⁵⁹.

Se preparó una solución de sustrato con 315 µL de ácido hialurónico disuelto en 90 µL de buffer fosfato. La solución de hialuronidasa bovina (Sigma-

Aldrich) se preparó en buffer enzimático hasta llegar a una concentración final de 10 U/mL. Las soluciones de muestra, correspondientes a los extractos de *T. indica*, se disolvieron en una mezcla de DMSO al 1 % (v/v) y agua destilada, obteniéndose soluciones stock a una concentración de 1 mg/mL. A partir de estas, se prepararon diluciones seriadas en microplaca con agua destilada para alcanzar concentraciones finales comprendidas entre 10 y 100 µg/mL, empleando un volumen de 20 µL por pocillo. Posteriormente, se añadieron 40 µL de la solución de enzima hialuronidasa a cada pocillo.

Para el control sin inhibidor (NIC) se añadió 40 µL de la enzima hialuronidasa, mientras que en el pocillo de control sin enzima (NEC) se añadió 40 µL de buffer enzimático; después se agregó 40 µL de la solución sustrato de ácido hialurónico a todos los pocillos, seguido de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente.

Se agregó 160 µL de reactivo Stop (incluido en el ensayo) a todos los pocillos; la microplaca se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se midió la intensidad de la formación del complejo a densidad óptica de 600 nm.

Como estándar de referencia de inhibidor de hialuronidasa, se empleó el ácido *6-O-palmitoil-L-ascórbico* (Sigma-Aldrich), conforme a la recomendación del fabricante, evaluado en el mismo intervalo de concentraciones que los extractos (10–100 µg/mL) ⁶⁰. El procedimiento experimental se realizó por triplicado.

El porcentaje de inhibición de hialuronidasa por los extractos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición hialuronidasa} = 1 - \left[\frac{(A_{\text{NEC}} - A_{\text{muestra}})}{(A_{\text{NEC}} - A_{\text{NIC}})} \right] \times 100$$

donde:

A_{NEC} corresponde a la absorbancia del control sin enzima; A_{muestra} corresponde a la absorbancia de las muestras que contienen el extracto; y A_{NIC} corresponde a la absorbancia del control sin inhibidores.

6.7 Evaluación *in vitro* de citotoxicidad

La citotoxicidad de los extractos de *T. indica* se evaluó frente a la línea celular de fibroblastos pulmonares humanos normales (sanos) ^{61,62}.

6.7.1 Cultivo celular

La línea celular MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano) se cultivó en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) (Gibco), suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) y 1 % de penicilina/estreptomicina, a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂.

Para el desprendimiento celular durante los subcultivos, se utilizó una solución de tripsina al 0.25 % con EDTA 0.06 mM en solución salina buffer fosfato (PBS).^{63,64}.

6.7.2 Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los extractos se evaluó mediante el ensayo colorimétrico MTT *bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*; fundamentado en la conversión de la sal de tetrazolio MTT, de color amarillo en cristales de formazán de color violeta por células metabólicamente activas que contienen enzimas oxidorreductasas dependientes del NADPH. La cuantificación del formazán formado permite estimar el número de células viables (Figura 3).^{65,66}

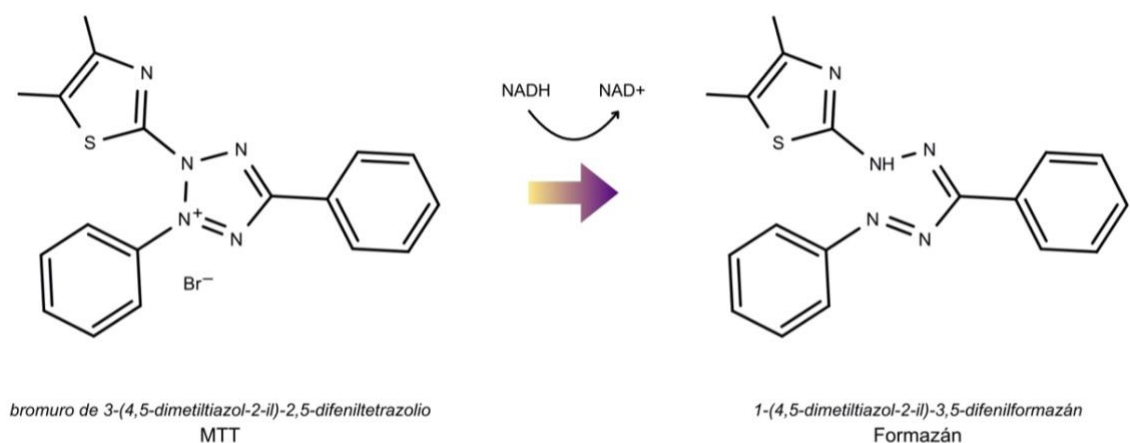


Figura 3. Reacción del ensayo MTT, basada en la reducción de la sal de tetrazolio MTT a formazán insoluble por la actividad metabólica de las mitocondrias en células viables.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.5×10^4 células por pocillo. Como control negativo, se emplearon células cultivadas en MEM con DMSO, sin tratamiento con extractos, para establecer la viabilidad celular basal. Después de 24 horas de incubación, las células se trataron con diferentes concentraciones (1–1000 $\mu\text{g/mL}$) de los extractos de *T. indica* durante 48 horas y se añadió un control de color para cada extracto.

Al finalizar el tratamiento, se realizó un lavado con PBS y se añadieron 50 μL de la solución MTT (5 mg/mL) a cada pocillo. Posteriormente, las células se incubaron durante 4 horas a 37°C en atmósfera 5 % CO_2 . Los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 570 nm.^{52,65,67}

El procedimiento experimental se realizó por triplicado para cada concentración en una microplaca y se elaboraron 3 microplacas en total para confirmación de resultados.

El porcentaje de viabilidad celular por los extractos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{A_{\text{CT}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{CN}} - A_{\text{blanco}}} \times 100$$

donde:

A_{CT} corresponde a la absorbancia de las células expuestas a tratamiento con extracto de tegumento/cáscaras; A_{CN} corresponde a la absorbancia del control negativo (células sin tratamiento); y A_{blanco} corresponde a la absorbancia del blanco (vehículo, sin células).

La citotoxicidad celular por los extractos se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = 100 - \text{viabilidad celular}$$

donde:

% Citotoxicidad corresponde a la reducción porcentual de la viabilidad celular respecto al control no tratado para cada concentración evaluada de los extractos.

La concentración inhibitoria media (IC_{50}) corresponde a la concentración del extracto necesaria para reducir la viabilidad celular en 50 % respecto al control no tratado.

6.8 Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante el desarrollo del presente proyecto fueron dispuestos conforme a lo establecido en el Programa Institucional para el Manejo y Gestión de Residuos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Colector	Residuo	Estimado
A	Soluciones salinas, ácidos y bases inorgánicas	2 L
C	Inflamables, aminas, solventes orgánicos no halogenados	3 L
H	Oxidantes	10 mL
Verde	Basura industrial, absorbentes impregnados y guantes	2 kg
R.P.B.I.	Residuos peligrosos biológico-infecciosos	1 kg

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Extractos etanólicos de *T. indica*

7.1.1 Extracto etanólico de tegumento de semillas

Se realizó la extracción etanólica partiendo de un peso inicial de 269 g de semillas de *T. indica*, de las cuales se separó 45 g de tegumento, resultando en 40 g de extracto con un rendimiento de 88.8 % (Figura 5).



Figura 4. Extracto obtenido a partir de tegumento de semillas de tamarindo

7.1.2 Extracto etanólico de cáscaras

Se realizó la extracción etanólica partiendo de un peso inicial de 223 g de cáscaras de *T. indica*, resultando en 15.3 g de extracto con un rendimiento de 6.86 % (Figura 4).



Figura 5. Extracto obtenido a partir de cáscaras de tamarindo

7.2 Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos en el ensayo DPPH (Figura 6) muestran que tanto el extracto de cáscara como el de tegumento presentan propiedades antioxidantes. El ácido ascórbico, un conocido antioxidante ampliamente utilizado en la industria cosmética, se utilizó como estándar de referencia.

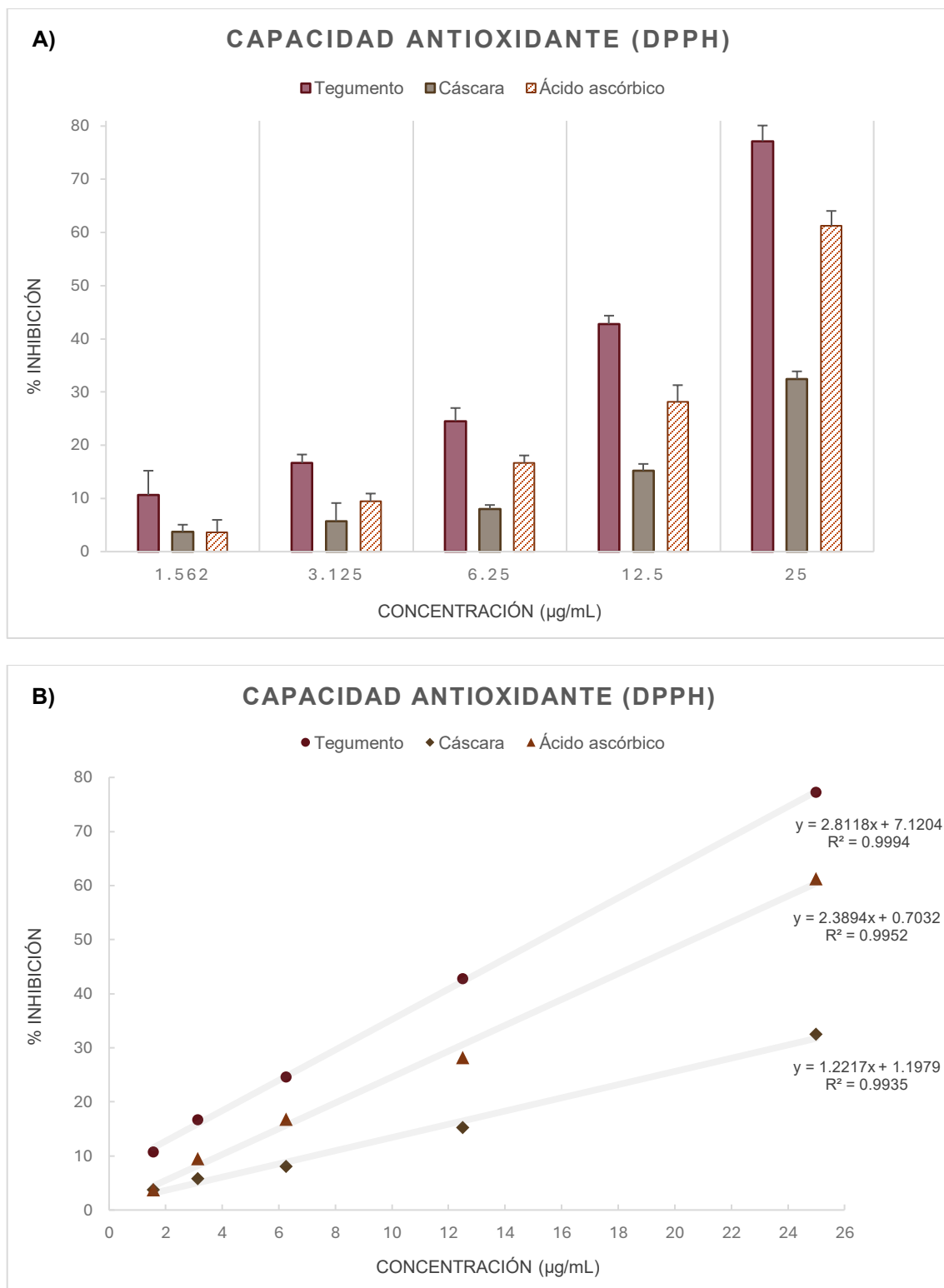


Figura 6. Actividad antioxidante de los extractos de *T. indica* en comparación con ácido ascórbico mediante el ensayo DPPH. **A)** Porcentaje de inhibición del radical DPPH a diferentes concentraciones, expresado como media $\pm$ DE (n = 3). **B)** Relación concentración–respuesta de los tratamientos evaluados.

El efecto antioxidante del extracto de tegumento presentó una relación concentración–respuesta lineal (Figura 6B) ($y=2.8118x + 7.1204$; $R^2 = 0.9994$), similar a la observada para el ácido ascórbico ($y= 2.3894x + 0.7031$; $R^2 = 0.9952$). Por su parte, el extracto de cáscara presentó una respuesta antioxidante inferior, representado por la ecuación $y = 1.2217x + 1.1978$ ($R^2 = 0.9935$).

TABLA 1

Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) de DPPH

Tratamiento	IC ₅₀ DPPH
Tegumento	15.15 ± 0.67 µg/mL ^a
Cáscara	33.18± 0.7 µg/mL ^b
Ácido ascórbico	20.74 ± 0.52 ug/mL ^c

Los datos se expresan como media ± DE (n=3). Diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc Tukey B ($p < 0.001$) (IBM SPSS Statistics 25.0), letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Con el fin de comparar cuantitativamente la capacidad antioxidante de los extractos, se calcularon los valores de IC₅₀ a partir del ajuste de las curvas dosis–respuesta; se muestra que el extracto de tegumento presentó el menor valor de IC₅₀, seguido del ácido ascórbico, mientras que el extracto de cáscara presenta el valor más alto (Tabla 1).

7.3 Contenido fenólico total

El contenido fenólico total de los extractos se determinó mediante el método de Folin–Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar.

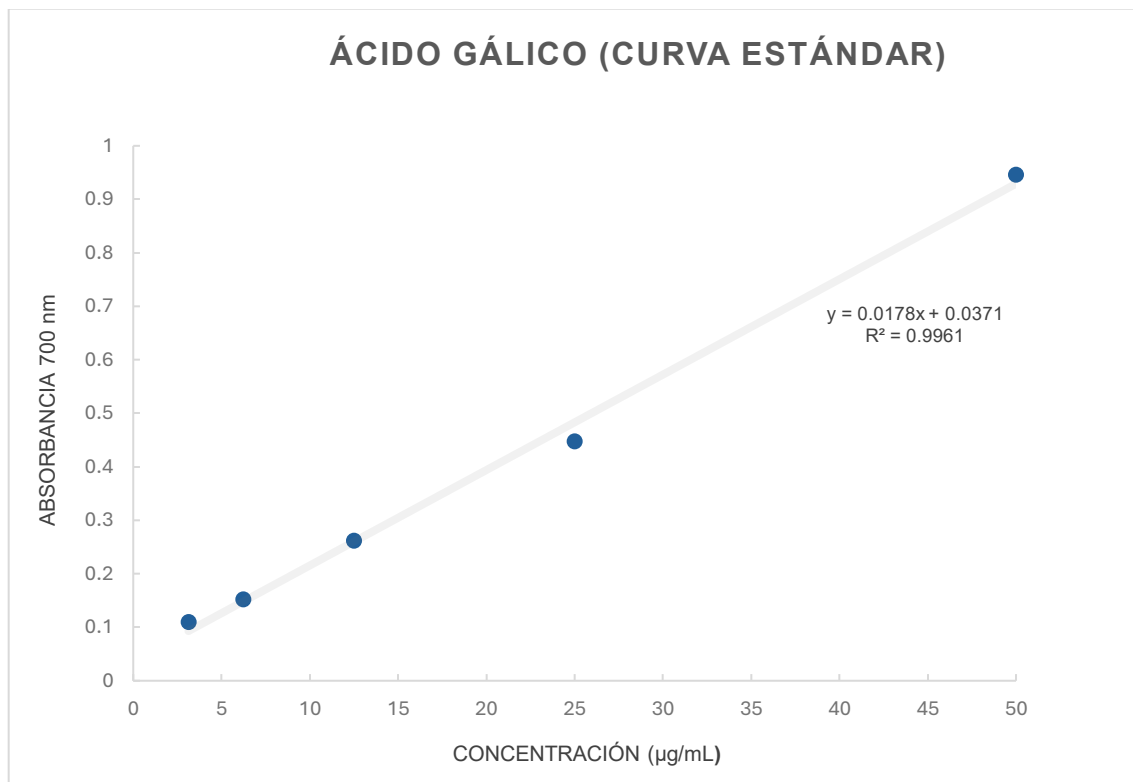


Figura 7. Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la determinación del contenido fenólico total mediante el método de Folin–Ciocalteu ($R^2 = 0.9961$).

A partir de la curva de calibración de ácido gálico obtenida (Figura 7), se cuantificó el contenido fenólico total de los extractos analizados.

Las absorbancias medidas para cada muestra se interpolaron en la ecuación de la curva estándar, permitiendo expresar los resultados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg GAE/g) utilizado en el ensayo (Tabla 2).

TABLA 2

Contenido Fenólico Total

Extracto	Contenido Fenólico Total
Tegumento	160.12 ± 2.58 mg GAE / g extracto
Cáscara	53.213 ± 2.12 mg GAE / g extracto

Valores de contenido fenólico total de los extractos calculados a partir de la concentración 12.5 ug/mL, los datos se expresan como media ± DE (n=3).

7.4 Actividad anti-elastasa

Se evaluó la capacidad inhibitoria frente a elastasa de los extractos de tegumento y cáscara. Como control positivo se utilizó MeOSuc-AAPV-CMK (*N*-(*metoxisuccinil*)-*Ala-Ala-Pro-Val-clorometilcetona*), conforme a lo recomendado por el fabricante.

Los resultados (Tabla 3) se presentan a partir del análisis dosis–respuesta y la estimación de los valores de IC₅₀ mediante regresión no lineal.

TABLA 3Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) de Elastasa

Tratamiento	IC ₅₀ en Elastasa
Tegumento	3.01 ± 0.10 µg/mL ^a
Cáscara	142.66 ± 15.26 µg/mL ^b
MeOSuc-AAPV-CMK	0.121 ± 0.0012 µg/mL ^c

Los datos se expresan como media ± DE (n=3). Diferencias estadísticas se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc Tukey B ($p < 0.001$) (IBM SPSS Statistics 25.0), letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

7.5 Actividad anti-hialuronidasa

Se evaluó la capacidad inhibitoria frente a hialuronidasa de los extractos de tegumento y cáscara. Como control positivo se utilizó palmitato de ascorbilo (*ácido 6-O-palmitoil-L-ascórbico*), conforme a lo recomendado por el ensayo. Los resultados (Tabla 4) se presentan a partir del análisis dosis–respuesta y la estimación de los valores de IC₅₀ mediante regresión no lineal.

TABLA 4

Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) de Hialuronidasa

Tratamiento	IC ₅₀ en Hialuronidasa
Tegumento	59.27 ± 0.05 µg/mL
Cáscara	253.5 ± 19.1 µg/mL
Palmitato de ascorbilo	96.25 ± 5.30 µg/mL

Los datos se expresan como media ± DE (n=2) la comparación estadística entre curvas se realizó mediante una prueba F de suma extra de cuadrados.

5.5 Citotoxicidad en cultivo celular

Se evaluó la citotoxicidad de los extractos de tegumento y cáscara en células MRC-5 mediante el ensayo MTT.

Las células MRC-5 son una línea celular diploide fibroblástica humana, son adherentes, no tumorales y con vida útil limitada.

Las células fueron proporcionadas por el Laboratorio de la Unidad de Formulación de Biológicos del Departamento de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB).



Figura 8. Células MRC-5, fotografía tomada en microscopio invertido (ZEISS, Primovert) Laboratorio FCB-UANL.

Los resultados (Tabla 5) se presentan a partir de la determinación de la citotoxicidad celular en función de la concentración más alta de los extractos evaluados (1 mg/mL) .

TABLA 5

Citotoxicidad de los extractos de *T. indica* en fibroblastos humanos MRC-5

Tratamiento	Citotoxicidad	IC ₅₀ en MRC-5
Tegumento	0%	> 0.83 mg/mL
Cáscara	0%	> 0.83 mg/mL

Los datos se expresan como media de tres experimentos independientes (n = 3). No se registró citotoxicidad en las concentraciones evaluadas. La concentración máxima evaluada de los extractos fue 0.83 mg/mL; por lo tanto, IC₅₀ se consideró superior a esta concentración.

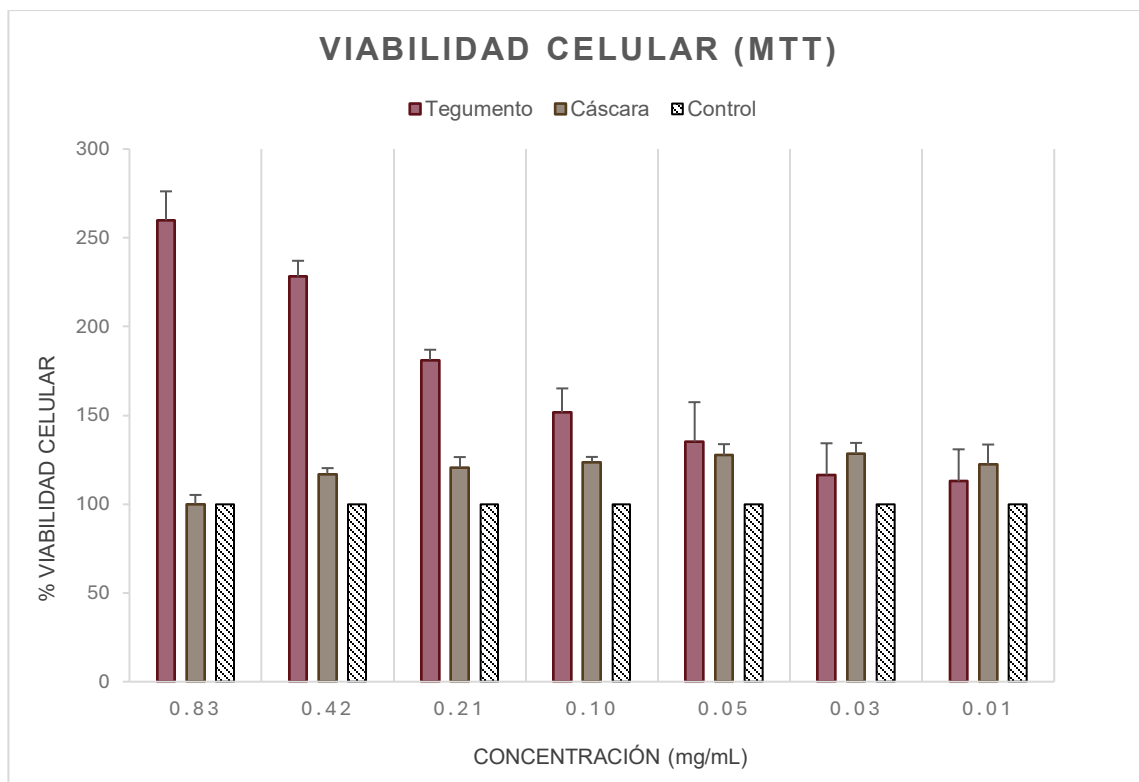


Figura 9. Viabilidad celular (%) de células MRC-5 tratadas con extractos de *T. indica*, determinada mediante el ensayo MTT. Células MRC-5 sin tratamiento se utilizaron como control negativo de citotoxicidad y como referencia de viabilidad basal. Los datos se expresan como media $\pm$ DE de tres experimentos independientes ($n = 3$), realizados por triplicado técnico.

El análisis estadístico de los resultados del ensayo MTT se realizó mediante un ANOVA de dos vías, evaluando los efectos de la concentración, del tratamiento y de su interacción sobre la viabilidad celular. En todos los casos se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el efecto antienviejimiento de los extractos de cáscara y tegumento de semilla de *T. indica* considerando su actividad antioxidante, capacidad inhibitoria de enzimas relacionadas con la degradación de la matriz extracelular y su efecto sobre la viabilidad de fibroblastos humanos. El análisis se centró en las diferencias observadas entre ambos extractos y su relación con su contenido de compuestos fenólicos.

En el ensayo de DPPH, el extracto de tegumento exhibió una capacidad antioxidante significativamente mayor ($IC_{50} = 15.14 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$) en comparación con la obtenida para el extracto de cáscara ($IC_{50} = 33.18 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$). Notablemente, el rendimiento del tegumento superó al del ácido ascórbico ($IC_{50} = 20.74 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$) utilizado como antioxidante de referencia. Los resultados obtenidos concuerdan con antecedentes reportados para extractos de *T. indica*; Lourith *et al.* observaron que una fracción en acetato de etilo de tegumento de semilla presentó una actividad antioxidante ($IC_{50} = 1.791 \mu\text{g/mL}$) superior al ácido ascórbico ⁴². De manera similar, Phetdee *et al.* ⁴⁴ y Wandee *et al.* Documentaron una elevada actividad antioxidante en extractos alcohólicos y etanólicos de semillas de *T. indica* frente a diversos estándares de referencia ^{44,51}. Aunque los valores absolutos de IC_{50} en la literatura difieren de

los obtenidos en este trabajo, dichas variaciones son atribuibles a factores intrínsecos como el origen de la materia vegetal, el método y solvente de extracción, las condiciones experimentales de los ensayos y la concentración final de metabolitos secundarios en cada muestra ⁶⁸.

Esta marcada actividad antioxidante podría asociarse con el contenido de compuestos fenólicos totales. En el presente estudio, el extracto de tegumento cuantificó aproximadamente tres veces más polifenoles (160.12 ± 2.58 mg GAE/g de extracto) que el extracto de cáscara (53.21 ± 2.12 mg GAE/g de extracto). Esta relación entre contenido fenólico y actividad antioxidante ha sido ampliamente descrita para diversos extractos de *T. indica* ^{43,48–50,69} y se fundamenta en la capacidad de los polifenoles para neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante mecanismos de donación de electrones o transferencia de átomos de hidrógeno ⁵⁴.

En los ensayos de inhibición enzimática se observó un comportamiento similar; frente a elastasa, el extracto de tegumento registró una actividad inhibitoria ($IC_{50} = 3.01 \pm 0.10$ µg/mL) considerablemente superior a la del extracto de cáscara ($IC_{50} = 142.66 \pm 15.26$ µg/mL), si bien el control positivo sintético *MeOSuc-AAPV-CMK* ($IC_{50} = 0.121 \pm 0.0012$ µg/mL) exhibió la mayor potencia inhibitoria, los valores de los extractos adquieren relevancia al tratarse de mezclas crudas y no de compuestos purificados. Al contrastar estos hallazgos con otros extractos vegetales evaluados bajo metodologías similares, Ibrahim *et al.* ⁵⁸ reportaron para un extracto hexánico de romero un IC_{50} de 57.61 ± 2.93 µg/mL frente a elastasa. Esto posiciona al extracto de tegumento de *T. indica* en

un rango de potencia inhibitoria superior al de otros extractos fitoterapéuticos de uso común⁷⁰.

Frente a la hialuronidasa, también se confirmó la superioridad del tegumento ($IC_{50} = 59.27 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$) en comparación con el extracto de cáscara ($IC_{50} = 253.5 \pm 19.1 \mu\text{g/mL}$) y el palmitato de ascorbilo empleado como control ($IC_{50} = 96.25 \pm 5.30 \mu\text{g/mL}$). De manera similar, los valores de inhibición reportados para esta enzima por Ibrahim *et al.*⁶⁷, también resultan inferiores para el extracto de romero ($IC_{50} = 448.1 \pm 22.8 \mu\text{g/mL}$) y para el control 1,10-fenantrolina ($IC_{50} = 234.6 \pm 11.9 \mu\text{g/mL}$). En conjunto, estos datos sugieren que los extractos de *T. indica*, particularmente el tegumento, poseen actividad antioxidante y una capacidad protectora contra la degradación de los componentes estructurales de la MEC, siendo consistente con lo descrito por Waqas *et al.*⁴⁷ quienes desarrollaron una emulsión agua/aceite con extracto de semilla de *T. indica* y observaron una disminución significativa de parámetros asociados con pérdida estructural de la MEC, así como un aumento en la retención de agua en la piel.

Finalmente, mediante el ensayo de MTT, se demostró que ninguno de los extractos afectó negativamente la viabilidad de fibroblastos MRC-5 dentro del rango de concentraciones analizado (0.01-0.83 mg/mL). Ante esta ausencia de citotoxicidad, el valor de IC_{50} se determinó como superior a la concentración máxima evaluada, un comportamiento alineado con antecedentes que asocia a distintos extractos de *T.indica* con una baja o nula toxicidad en fibroblastos, queratinocitos y otros modelos celulares^{44,46,50,52}.

A través de un análisis de ANOVA de dos vías, se identificó un incremento estadísticamente significativo en la viabilidad celular ($p < 0.001$), el cual presentó una dependencia tanto del tipo de tratamiento como de la concentración empleada. De manera similar, Khongkow *et al.* ⁷¹ reportaron que un hidrogel basado en semillas de *T. indica* no exhibió citotoxicidad en fibroblastos dérmicos en un rango de 0 a 10 mg/mL, e incluso favoreció la proliferación celular. En concordancia, Nie y Deters ⁷² informaron que los xiloglucanos aislados de estas semillas incrementaron la actividad metabólica, la proliferación y la migración de queratinocitos y fibroblastos humanos; dicho efecto fue atribuido a la internalización celular de estos polisacáridos y a la activación de vías de señalización proliferativas, como ERK/MAPK. Si bien estos antecedentes respaldan el potencial de los derivados de *T. indica* para promover procesos vinculados a la regeneración cutánea, las diferencias en composición entre las fracciones purificadas anteriormente descritas y los extractos etanólicos evaluados limitan una comparación directa. Asimismo, dado que el ensayo de MTT evalúa la citotoxicidad midiendo la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en células viables, los incrementos observados en este estudio deben interpretarse como un aumento en la actividad metabólica celular respecto al control; se requieren ensayos complementarios para confirmar si los extractos de cáscara y tegumento inducen un efecto proliferativo en células sanas ⁶⁶.

En conjunto, el análisis de los datos obtenidos permite integrar la actividad antioxidante, la inhibición de algunas enzimas degradantes de la MEC y la ausencia de citotoxicidad en fibroblastos MRC-5 como indicadores complementarios del potencial antienviejecimiento *in vitro* de los extractos

evaluados. Esta interpretación debe considerarse dentro del alcance experimental del estudio, ya que los ensayos realizados permiten evaluar la actividad bioactiva preliminar, pero no establecen por sí solos la eficacia dermatológica en modelos más complejos.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de cáscara y tegumento de semillas de *T. indica* presentaron actividades biológicas diferentes bajo las condiciones experimentales evaluadas.

El extracto de tegumento registró una mayor capacidad antioxidante, asociada a un mayor contenido de polifenoles totales, así como una actividad inhibitoria más potente frente a elastasa y hialuronidasa en comparación con el extracto de cáscara y con los controles utilizados. El extracto de cáscara, aunque menos activo que el tegumento, presentó capacidad antioxidante y actividad inhibitoria frente a las enzimas evaluadas, situándose dentro de los rangos reportados para extractos vegetales bioactivos.

En la evaluación de citotoxicidad mediante el ensayo MTT en células de fibroblastos humanos MRC-5, ninguno de los extractos registró efectos citotóxicos detectables en el rango de concentraciones evaluado.

En conjunto, se acepta la hipótesis planteada, los resultados demuestran que los extractos, particularmente el de tegumento, presentan un perfil bioactivo y de seguridad *in vitro* favorable, lo que respalda su potencial para futuras evaluaciones en aplicaciones farmacéuticas.

Asimismo, el origen agroindustrial de los extractos evaluados evidencia la posibilidad de integrar subproductos del procesamiento alimentario en México, considerados residuos, convirtiéndolos nuevamente en recursos con aplicación dermatológica.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos abren la posibilidad de profundizar en la composición química de los extractos, particularmente del extracto de tegumento, mediante la identificación y cuantificación de los compuestos responsables de la actividad observada. Asimismo, sería pertinente ampliar la evaluación biológica en modelos celulares adicionales y, posteriormente, en modelos *in vivo* que permitan corroborar los efectos antienviejimiento bajo condiciones más complejas.

Desde el punto de vista farmacéutico, futuros estudios podrían enfocarse en la estandarización del extracto, la evaluación de estabilidad y el desarrollo preliminar de formulaciones tópicas que permitan explorar su aplicabilidad.

Finalmente, se considera relevante investigar la optimización del proceso de extracción y su posible escalamiento, con el fin de valorar la viabilidad técnica del aprovechamiento de estos residuos agroindustriales.

REFERENCIAS

1. Yin, Z., & Ren, H. (2023). *Aquaporins in Skin* (pp. 211–223). https://doi.org/10.1007/978-981-19-7415-1_15
2. Harris-Tryon, T. A., & Grice, E. A. (2022). Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science*, 376(6596), 940–945. <https://doi.org/10.1126/science.abo0693>
3. Swaney, M. H., & Kalan, L. R. (2021). Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms. *Infection and Immunity*, 89(4). <https://doi.org/10.1128/IAI.00695-20>
4. Zhang, C., Merana, G. R., Harris-Tryon, T., & Scharschmidt, T. C. (2022). Skin immunity: dissecting the complex biology of our body's outer barrier. *Mucosal Immunology*, 15(4), 551–561. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00505-y>
5. Jakovija, A., & Chtanova, T. (2023). Skin immunity in wound healing and cancer. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1060258>
6. Kruse, V., Neess, D., & Færgeman, N. J. (2017). The Significance of Epidermal Lipid Metabolism in Whole-Body Physiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(9), 669–683. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.06.001>

7. Slominski, A. T., Slominski, R. M., Raman, C., Chen, J. Y., Athar, M., & Elmets, C. (2022). Neuroendocrine signaling in the skin with a special focus on the epidermal neuropeptides. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 323(6), C1757–C17. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00147.2022>
8. Shin, S. H., Lee, Y. H., Rho, N.-K., & Park, K. Y. (2023). Skin aging from mechanisms to interventions: focusing on dermal aging. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1195272>
9. Ledberg, A. (2020). Exponential increase in mortality with age is a generic property of a simple model system of damage accumulation and death. *PLOS ONE*, 15(6), e0233384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233384>
10. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
11. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
12. Sreedhar, A., Aguilera-Aguirre, L., & Singh, K. K. (2020). Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell Death & Disease*, 11(6), 444. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2649-z>
13. Evangelista, M., Mota, S., Almeida, I. F., & Pereira, M. G. (2022). Usage Patterns and Self-Esteem of Female Consumers of Antiaging Cosmetic Products. *Cosmetics*, 9(3), 49. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9030049>
14. Lee, H., Hong, Y., & Kim, M. (2021). Structural and Functional Changes and Possible Molecular Mechanisms in Aged Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12489. <https://doi.org/10.3390/ijms222212489>

15. Chin, T., Lee, X. E., Ng, P. Y., Lee, Y., & Dreesen, O. (2023). The role of cellular senescence in skin aging and age-related skin pathologies. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1297637>
16. Papaccio, F., D'Arino, A., Caputo, S., & Bellei, B. (2022). Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants*, 11(6), 1121. <https://doi.org/10.3390/antiox11061121>
17. Bonté, F., Girard, D., Archambault, J.-C., & Desmoulière, A. (2019). *Skin Changes During Ageing* (pp. 249–280). https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_10
18. Gu, Y., Han, J., Jiang, C., & Zhang, Y. (2020). Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. *Ageing Research Reviews*, 59, 101036. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101036>
19. Qin, Z., Balimunkwe, R. M., & Quan, T. (2017). Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin *in vivo*. *British Journal of Dermatology*, 177(5), 1337–1348. <https://doi.org/10.1111/bjd.15379>
20. Shin, J.-W., Kwon, S.-H., Choi, J.-Y., Na, J.-I., Huh, C.-H., Choi, H.-R., & Park, K.-C. (2019). Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2126. <https://doi.org/10.3390/ijms20092126>
21. Novotná, R., Škařupová, D., Hanyk, J., Ulrichová, J., Křen, V., Bojarová, P., Brodsky, K., Vostálová, J., & Franková, J. (2023). Hesperidin, Hesperetin, Rutinose, and Rhamnose Act as Skin Anti-Aging Agents. *Molecules*, 28(4), 1728. <https://doi.org/10.3390/molecules28041728>

22. Favas, R., Morone, J., Martins, R., Vasconcelos, V., & Lopes, G. (2021). Cyanobacteria and microalgae bioactive compounds in skin-ageing: potential to restore extracellular matrix filling and overcome hyperpigmentation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 1829–1838. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1960830>
23. Chen, F., Guo, X., & Wu, Y. (2023). Skin antiaging effects of a multiple mechanisms hyaluronan complex. *Skin Research and Technology*, 29(6). <https://doi.org/10.1111/srt.13350>
24. Reuter, J., Merfort, I., & Schempp, C. M. (2010). Botanicals in Dermatology. *American Journal of Clinical Dermatology*, 1. <https://doi.org/10.2165/11533220-000000000-00000>
25. Majidinia, M., Karimian, A., Alemi, F., Yousefi, B., & Safa, A. (2020). Targeting miRNAs by polyphenols: Novel therapeutic strategy for aging. *Biochemical Pharmacology*, 173, 113688. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113688>
26. Bouzroud, S., El Maaiden, E., Sobeh, M., Merghoub, N., Boukcim, H., Kouisni, L., & El Kharrassi, Y. (2023). Biotechnological Approaches to Producing Natural Antioxidants: Anti-Ageing and Skin Longevity Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1397. <https://doi.org/10.3390/ijms24021397>
27. Mohd Zaid, N. A., Sekar, M., Bonam, S. R., Gan, S. H., Lum, P. T., Begum, M. Y., Mat Rani, N. N. I., Vaijanathappa, J., Wu, Y. S., Subramaniyan, V., Fuloria, N. K., & Fuloria, S. (2022). Promising Natural Products in New Drug Design, Development, and Therapy for Skin Disorders: An Overview of Scientific Evidence and Understanding Their Mechanism of Action. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 16, 23–66. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S326332>

28. Lee, J. H., Park, J., & Shin, D. W. (2022). The Molecular Mechanism of Polyphenols with Anti-Aging Activity in Aged Human Dermal Fibroblasts. *Molecules*, 27(14), 4351. <https://doi.org/10.3390/molecules27144351>
29. Suzuki, T., Ohishi, T., Tanabe, H., Miyoshi, N., & Nakamura, Y. (2023). Anti-Inflammatory Effects of Dietary Polyphenols through Inhibitory Activity against Metalloproteinases. *Molecules*, 28(14), 5426. <https://doi.org/10.3390/molecules28145426>
30. Bernatoniene, J., & Kopustinskiene, D. M. (2018). The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*, 23(4), 965. <https://doi.org/10.3390/molecules23040965>
31. Daré, R. G., Nakamura, C. V., Ximenes, V. F., & Lautenschlager, S. O. S. (2020). Tannic acid, a promising anti-photoaging agent: Evidences of its antioxidant and anti-wrinkle potentials, and its ability to prevent photodamage and MMP-1 expression in L929 fibroblasts exposed to UVB. *Free Radical Biology and Medicine*, 160, 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.019>
32. Liu, S., You, L., Zhao, Y., & Chang, X. (2018). Hawthorn Polyphenol Extract Inhibits UVB-Induced Skin Photoaging by Regulating MMP Expression and Type I Procollagen Production in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(32), 8537–8546. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02785>
33. Reguengo, L. M., Salgaço, M. K., Sivieri, K., & Maróstica Júnior, M. R. (2022). Agro-industrial by-products: Valuable sources of bioactive compounds. *Food Research International*, 152, 110871. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110871>

34. Lemes, A. C., Egea, M. B., Oliveira Filho, J. G. de, Gautério, G. V., Ribeiro, B. D., & Coelho, M. A. Z. (2022). Biological Approaches for Extraction of Bioactive Compounds From Agro-industrial By-products: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.802543>
35. Montañez-Valdez, O. D., Guerra-Medina, C. E., Chávez-Espinoza, M., Reyes-Gutiérrez, J. A., Vicente-Pérez, R., & Ley de Coss, A. (2023). COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DEGRADABILIDAD in situ DEL TAMARINDO (*Tamarindus indica* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 46(4A), 529. <https://doi.org/10.35196/rfm.2023.4A.529>
36. Gonçalves, J., Anjos, O., & Guiné, R. P. F. (2025). A Revisit of Plant Food Waste Along Food Supply Chains: Impacts and Perspectives. *Foods*, 14(8), 1364. <https://doi.org/10.3390/foods14081364>
37. Casas-Godoy, L., & Barrera-Martínez, I. (2021, January 27). *Revalorización de Residuos Agroindustriales: Caso Jalisco*. Centro de Investigación y Asistencia En Tecnología y Diseño Del Estado de Jalisco A.C.
38. De Caluwé, E., Halamouá, K., & Van Damme, P. (2010). *Tamarindus indica* L. – A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Afrika Focus*, 23(1), 53–83. <https://doi.org/10.1163/2031356X-02301006>
39. Fagbemi, K. O., Aina, D. A., Adeoye-Isijola, M. O., Naidoo, K. K., Cooposamy, R. M., & Olajuyigbe, O. O. (2022). Bioactive compounds, antibacterial and antioxidant activities of methanol extract of *Tamarindus indica* Linn. *Scientific Reports*, 12(1), 9432. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13716-x>

40. Sudjaroen, Y., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H., & Owen, R. W. (2005). Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicology*, 43(11), 1673–1682. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.05.013>
41. Bonin, E., Avila, V. D., Carvalho, V. M., Cardoso, M. A. P., Matos, A. M., Ramos, A. V. G., Cabral, M. R. P., Baldoqui, D. C., Sarragiotto, M. H., Filho, B. A. de A., & Prado, I. N. do. (2023). Study of chemical constituents, antioxidants and antimicrobial activities of *Tamarindus indica* L. seed. *Journal of Food Science*, 88(11), 4639–4652. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16739>
42. Lourith, N., Kanlayavattanakul, M., & Chanpirom, S. (2009). Free radical scavenging efficacy of Tamarind Seed coat and its cosmetics application. *Journal of Health Research*, 23(4), 159–162.
43. Lim, C. Y., Mat Junit, S., Abdulla, M. A., & Abdul Aziz, A. (2013). In Vivo Biochemical and Gene Expression Analyses of the Antioxidant Activities and Hypocholesterolaemic Properties of *Tamarindus indica* Fruit Pulp Extract. *PLoS ONE*, 8(7), e70058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070058>
44. Phetdee, K., Rakchai, R., Rattanamanee, K., Teaktong, T., & Viyoch, J. (2014). Preventive effects of tamarind seed coat extract on UVA-induced alterations in human skin fibroblasts. *Journal of Cosmetic Science*, 65(1), 11–24.
45. Sandesh, P., Velu, V., & Singh, R. P. (2014). Antioxidant activities of tamarind (*Tamarindus Indica*) seed coat extracts using in vitro and in vivo models. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1965–1973. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1210-9>

46. Nakchat, O., Nalinratana, N., Meksuriyen, D., & Pongsamart, S. (2014). Tamarind seed coat extract restores reactive oxygen species through attenuation of glutathione level and antioxidant enzyme expression in human skin fibroblasts in response to oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 379–385. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C806>
47. Waqas, M. K., Khan, B. A., Akhtar, N., Chowdhry, F., Khan, H., Bakhsh, S., Khan, S., & Rasul, A. (2017). Fabrication of Tamarindus indica seeds extract loaded-cream for photo-aged skin: Visioscan® studies. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 34(4), 339–345. <https://doi.org/10.5114/ada.2017.69314>
48. Komakech, R., Kim, Y., Matsabisa, G. M., & Kang, Y. (2019). Anti-inflammatory and analgesic potential of Tamarindus indica Linn. (Fabaceae): a narrative review. *Integrative Medicine Research*, 8(3), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2019.07.002>
49. Martins, C. M., Ferro, D. M., de Brito, E. S., & Ferreira, S. R. S. (2020). Industrial relevance of Tamarindus indica L. by-products as source of valuable active metabolites. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66, 102518. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102518>
50. Sookying, S., Duangjai, A., Saokaew, S., & Phisalprapa, P. (2022). Botanical aspects, phytochemicals, and toxicity of Tamarindus indica leaf and a systematic review of antioxidant capacities of T. indica leaf extracts. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.977015>
51. Wandee, R., Sutthanut, K., Songsri, J., Sonsena, S., Krongyut, O., Tippayawat, P., Tukummee, W., & Rittirod, T. (2022). Tamarind Seed Coat: A Catechin-Rich Source with Anti-Oxidation, Anti-Melanogenesis, Anti-Adipogenesis and Anti-Microbial Activities. *Molecules*, 27(16), 5319. <https://doi.org/10.3390/molecules27165319>

52. Li, W., Huang, R., Han, S., Li, X., Gong, H., Zhang, Q., Yan, C., Li, Y., & He, R. (2023). Potential of Tamarind Shell Extract against Oxidative Stress In Vivo and In Vitro. *Molecules*, 28(4), 1885. <https://doi.org/10.3390/molecules28041885>
53. Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
54. Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
55. Molecular Probes, Inc. (2001). *EnzChek Elastase Assay Kit E-12056 Instruction Manual*. <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp12056.pdf>
56. Powers, J. C., Gupton, B. F., Harley, A. D., Nishino, N., & Whitley, R. J. (1977). Specificity of porcine pancreatic elastase, human leukocyte elastase and cathepsin G Inhibition with peptide chloromethyl ketones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 485(1), 156–166. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90203-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(77)90203-0)
57. Stein, R. L., & Trainor, D. A. (1986). Mechanism of inactivation of human leukocyte elastase by a chloromethyl ketone: kinetic and solvent isotope effect studies. *Biochemistry*, 25(19), 5414–5419. <https://doi.org/10.1021/bi00367a011>
58. Ibrahim, N., Abbas, H., El-Sayed, N. S., & Gad, H. A. (2022). Rosmarinus officinalis L. hexane extract: phytochemical analysis, nanoencapsulation, and in silico, in vitro, and in vivo anti-photoaging potential evaluation. *Scientific Reports*, 12(1), 13102. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16592-7>

59. BioAssay Systems. (2022). *QuantiChrom Hyaluronidase Inhibitor Screening Assay Kit DIHY-100 Instruction Manual*. <https://bioassaysys.com/wp-content/uploads/DIHY.pdf>
60. Girish, K., Kemparaju, K., Nagaraju, S., & Vishwanath, B. (2009). Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 16(18), 2261–2288. <https://doi.org/10.2174/092986709788453078>
61. Alquraisy, A., Wilar, G., Mohammed, A., El-Rayyes, A., Suhandi, C., & Wathoni, N. (2024). A Comprehensive Review of Stem Cell Conditioned Media Role for Anti-Aging on Skin. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications, Volume 17*, 5–19. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S480437>
62. Guan, Y., Li, R., Lv, Z., Bo, N., Wang, T., Guo, Y., Liang, Z., Zhang, J., Fan, Q., Dang, L., Zhao, M., & Chen, J. (2026). The change in structure and improvement of anti-aging effects of polysaccharides in Polygonati Rhizoma after the traditional “Nine Steaming-Nine Sun-Drying.” *Carbohydrate Polymers*, 373, 124597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124597>
63. Yua, P.-R., Hsu, J.-Y., Tseng, C.-Y., Chen, J.-H., & Lin, H.-H. (2023). The inhibitory effect of quercetin-3-glucuronide on pulmonary injury in vitro and in vivo. *Journal of Food and Drug Analysis*, 31(2), 254–277. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3453>
64. Osorio-Ramírez, M. del C., Hernández-Melgar, A. G., Cembella, A. D., Maskrey, B. H., Díaz-Rubio, L. J., Córdova-Guerrero, I., Bernáldez-Sarabia, J., González-Maya, L., Esquivel-Rodríguez, B., Bustos-Brito, C., Licea-Navarro, A. F., & Durán-Riveroll, L. M. (2025). Untargeted Metabolomic Analysis and Cytotoxicity of Extracts of the Marine Dinoflagellate *Amphidinium eilatiense* Against Human Cancer Cell Lines. *Toxins*, 17(4), 150. <https://doi.org/10.3390/toxins17040150>

65. Maliyam, P., Laphookhieo, S., Koedrith, P., & Puttarak, P. (2024). Antioxidative and anti-cytogenotoxic potential of *Lysiphyllum strychnifolium* (Craib) A. Schmitz extracts against cadmium-induced toxicity in human embryonic kidney (HEK293) and dermal fibroblast (HDF) cells. *Heliyon*, 10(14), e34480. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34480>
66. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
67. Ibrahim, N., Abbas, H., El-Sayed, N. S., & Gad, H. A. (2022). *Rosmarinus officinalis* L. hexane extract: phytochemical analysis, nanoencapsulation, and in silico, in vitro, and in vivo anti-photoaging potential evaluation. *Scientific Reports*, 12(1), 13102. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16592-7>
68. Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A. F., Subramaniam, S., & Abdul-Aziz, A. (2012). Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. *Food Chemistry*, 131(2), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.001>
69. Fagbemi, K. O., Aina, D. A., Adeoye-Isijola, M. O., Naidoo, K. K., Cooposamy, R. M., & Olajuyigbe, O. O. (2022). Bioactive compounds, antibacterial and antioxidant activities of methanol extract of *Tamarindus indica* Linn. *Scientific Reports*, 12(1), 9432. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13716-x>
70. Michailidis, D., Angelis, A., Nikolaou, P. E., Mitakou, S., & Skaltsounis, A. L. (2021). Exploitation of *Vitis vinifera*, *Foeniculum vulgare*, *Cannabis sativa* and *Punica granatum* By-Product Seeds as Dermo-Cosmetic Agents. *Molecules*, 26(3), 731. <https://doi.org/10.3390/molecules26030731>

71. Khongkow, P., Khakhong, S., Thammarat, C., & Amnuaikit, T. (2024). Potential Bioactivities of Tamarind Seed Jellose at the Cellular Level for Cosmetic Product Development. *Sustainability*, 16(8), 3114. <https://doi.org/10.3390/su16083114>
72. Nie, W., & Deters, A. M. (2013). Tamarind Seed Xyloglucans Promote Proliferation and Migration of Human Skin Cells through Internalization via Stimulation of Proproliferative Signal Transduction Pathways. *Dermatology Research and Practice*, 2013, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/359756>