

**EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD
CAPTADORA DE RADICALES LIBRES DE EXTRACTOS
HIDROMETANÓLICOS DEL ESCARABAJO
Ulomoides dermestoides (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

EVALUATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT AND FREE RADICAL SCAVENGING
ACTIVITY OF HIDROMETHANOLIC EXTRACTS FROM *Ulomoides dermestoides*
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE).

Dary Luz Mendoza Meza, Carlos Maury Fals.

Grupo de Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas. Programa de Química,
Facultad de Ciencias Básicas. Universidad del Atlántico. Colombia.

Recibido: Agosto 31 de 2013

Aceptado: Septiembre 4 de 2013

*Correspondencia del autor. Grupo de Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas. Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas. Universidad del Atlántico. Km 7 antigua carretera a Puerto Colombia (Atlántico-Colombia).
Contacto: darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co

RESUMEN

Ulomoides dermestoides es un escarabajo Tenebrionidae, usado en China como afrodisiaco y nutracéutico. En Colombia, este escarabajo es consumido vivo como terapia para varias enfermedades tales como asma bronquial y la artritis reumatoide. El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de fenoles totales y la actividad captadora de radicales libres de extractos hidrometanólicos de *U. Dermestoides* adultos. Los extractos fueron obtenidos con MeOH 48% y los compuestos fenólicos se separaron por cromatografía de columna con la resina Amberlita XAD-2. El contenido total de fenoles fue determinado por el ensayo de Folin-Ciocalteu y los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de extracto seco (mg GAE/g ES). La actividad captadora de radicales fue medida de acuerdo a los métodos del DPPH• and ABTS•+ y los resultados se expresaron como porcentaje de captación de radicales (%CR). El contenido de fenoles totales en el extracto de *U. dermestoides* fue de 22.94 ± 0.34 mg GAE/g ES, los %CR para DPPH• and ABTS•+ fueron 90.62 ± 1.1 y 98.11 ± 0.84 , respectivamente. Todas las fracciones separadas de la resina Amberlita XAD-2 presentaron actividad captadora de radicales DPPH• and ABTS•+, sin embargo los eluidos con MeOH tuvieron mayor actividad. Estos resultados indican que el escarabajo *U. dermestoides* es fuente de antioxidantes y que estos compuestos podrían usarse como nutracéuticos.

Palabras clave: *Ulomoides dermestoides*, compuestos fenólicos, antioxidantes, radicales libres, DPPH, ABTS.

ABSTRACT

Ulomoides dermestoides is a tenebrionidae beetle, used in China as an aphrodisiac and nutraceutical food. In Colombia, these beetles are eaten alive in the treatment of some illnesses such as bronchial asthma and rheumatoid arthritis. The aims of this research were determined the total phenolic content and free radical scavenging activity of hidromethanolic extracts of *Ulomoides dermestoides* adults. The extracts were obtained with MeOH 48% and the phenolic compounds were separated by column chromatography on Amberlite XAD-2 resin. The total phenolic content was determined by using the Folin-Ciocalteu assay and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry weight (GAE mg/g ES). The radical scavenging activity was measured according to DPPH• and ABTS•+ methods and the results were expressed as the percentage of radical scavenging (% CR). The total phenolic content in the *Ulomoides dermestoides* extract was 22.94 ± 0.34 mg GAE /gES, % CR by DPPH• and ABTS•+ were 90.62 ± 1.1 and 98.11 ± 0.84 , respectively. All phenolic fractions showed free radical scavenging activity, however fractions separated with MeOH had a higher activity. These results indicate that *Ulomoides dermestoides* beetle is source of antioxidants and this compounds could be used as nutraceuticals.

Words Key: *Ulomoides dermestoides*, phenolic compounds, antioxidants, free radicals, DPPH, ABTS.

INTRODUCCIÓN

Muchas culturas alrededor del mundo utilizan insectos y algunos productos extraídos de ellos como recursos nutraceuticos (1). El *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878) (sinonimia: *Martianers dermestoides*; *Paulembus dermestoides*) es un coleóptero tenebrionido, de origen asiático, conocido en la cultura oriental por sus propiedades afrodisiacas y terapéuticas (2); en Centro y Sur América este coleóptero es consumido vivo como terapia alternativa para el asma bronquial, dermatitis, artritis reumatoide, hemorroides, diabetes mellitus, inflamaciones y diferentes tipos de cáncer, lo cual es conocido como coleopterapia (3-5).

A pesar del uso del *U. dermestoides* en medicina folclórica, los estudios científicos sobre este coleóptero se han enfocado en su biología y método de cultivo (6-8), no obstante en años recientes han surgido una serie de trabajos enfocados a demostrar los efectos terapéuticos que se le atribuyen. Santos y colaboradores (9) reportaron las propiedades anti-inflamatorias de extractos polares de cuerpo entero de *U. dermestoides*, usando el ensayo de edema plantar en rata inducido por carragenina y pruebas con células mononucleares de sangre periférica; Crespo y colaboradores (10) describieron las propiedades citotóxicas y genotóxicas de un extracto diclorometano de cuerpo entero de *U. dermestoides* y de la principal benzoquinona de su secreción de defensa, la 1,4-benzoquinina, sobre una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) y relacionaron este resultado con los reportes positivos del uso del coleóptero en el tratamiento alternativo del cáncer. Adicionalmente, nuestro grupo reportó actividad anti-irritante de extrac-

tos metanólicos del cuerpo entero del *U. dermestoides*, mediante el ensayo de inhibición de la lisis, hemorragia y coagulación de la membrana corioalantoidea de huevos de gallinas embrionados (HET-CAM), efecto que podría atribuirse a la presencia de compuestos con actividad antioxidante (11).

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (EROS) son uno de los principales mediadores de la inflamación en los tejidos animales. Existen numerosos mecanismos de defensa antioxidantes, generados por compuestos endógenos y exógenos, los cuales neutralizan las EROS (12); sin embargo, actualmente no existe suficiente evidencia científica que valide un mecanismo de defensa antioxidante a partir del escarabajo *U. dermestoides*. El propósito de este estudio fue evaluar el contenido de fenoles totales y la capacidad captadora de radicales libres DPPH• y ABTS•+ de extractos hidrometanólicos de *U. dermestoides*.

MATERIALES Y MÉTODOS**Muestras.**

Se utilizaron escarabajos adultos de la especie *Ulomoides dermestoides*, procedentes de un cultivo establecido en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad del Atlántico desde el año 2010. La identidad taxonómica de los escarabajos fue confirmada en el Departamento de Entomología del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (código de colección ICN-45905). Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa (70-75%), protegidos de la luz y alimentados solamente con salvado de tri-



Figura 1. Individuos adultos *Uromyces dermestoides*, coleoptera: tenebrionidae.

go y pan integral. Para la obtención de los extractos se utilizaron los individuos adultos del color más oscuro (Figura 1).

Extractos.

Los escarabajos (50 g) fueron separados del cultivo y triturados con mortero, bajo una corriente de nitrógeno líquido. Los extractos se produjeron por el método de extracción sólido-líquido con MeOH 48%, durante 48h a 4°C (relación peso/volumen = 1/10). Los productos se filtraron a través de membranas de fibra de vidrio y posteriormente al vacío en embudos Buchner. Los extractos clarificados se congelaron a -70°C y se liofilizaron por 48 horas a temperatura de -40°C y una presión de vacío de 0,133 mBar, en un equipo LABCONCO® Freeze Dryer; posteriormente se almacenaron en viales de vidrio de color ámbar, a temperatura de -20°C.

Cuantificación de fenoles totales.

Se realizó por el método Folin-Ciocalteu descrito por Ozgen y colaboradores (13) con algunas modificaciones. Se preparó 100 mL de una solución de concentración 0,2 mg/mL de extracto liofilizado de *U. dermestoides*. Un volumen de 2 mL de esta solución se mezcló con 2,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España) diluido al 10% en agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2 min, luego se agregó 2 mL de carbonato de sodio 7,5%, seguido de incubación a 50°C por 15 min. La absorbancia de la muestra se leyó en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 20, a longitud de onda de 765 nm, los resultados se interpolaron en una curva de calibración estándar de ácido gálico (0,1 a 0,0015 mg/mL) y se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (GAE) por gramo de extracto seco (mg GAE/g ES). El cálculo se realizó usando la ecuación 1:

$$\text{mg GAE/g ES} = \frac{C \times V}{M} \quad \text{Ec.1}$$

Donde,

C = concentración determinada por la curva estándar de ácido gálico en unidades de mg/mL.

V = Volumen del extracto usado en el ensayo.

M = masa del extracto liofilizado.

Separación de compuestos fenólicos.

Esta se realizó por cromatografía de columna (40 x 2 cm), usando la resina Amberlita XAD-2 (Sigma, 20-60 mesh), con una velocidad de flujo del solvente de 10 mL/min (14). Se agregó a la columna 0,5 g el extracto de *U. dermestoides* previamente disuelto en agua acidificada (pH 2 con HCl). Los compuestos se eluyeron con 20 mL de H₂O (F1), 20 mL de una mezcla MeOH:H₂O (1:1, v/v) (F2) y 20 mL de MeOH del 96% (F3). Todas las fracciones fueron concentradas a presión de 50 mbar y temperatura de 50°C en un rota-evaporador Laborata 4000 (Heidolph) y re-disueltos con 2 mL de MeOH.

Actividad captadora del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

Este ensayo se fundamenta en la medición de la diferencia de absorbancia del DPPH• en presencia de un blanco y de una sustancia antioxidante, a longitud de onda de 517 nm. El radical libre DPPH• de color púrpura acepta un electrón o un radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable de color amarillo. En este trabajo se utilizó el protocolo descrito previamente (15). Un volumen de 50 µL del extracto total de *U. dermestoides* (0,2 mg/mL) se mezcló con 2 mL de una solución metanólica de DPPH• 0,1M. La absorbancia de la mezcla se leyó a longitud de onda de 517 nm, cada minuto hasta completar 30 minutos, usando MeOH como blanco. El mismo procedimiento se llevó a cabo con las fracciones eluidas de la columna Amberlita XAD-2. La actividad captadora de radicales se calculó con la ecuación 2 y los resultados se expresaron como porcentaje de captación del radical (% CR).

$$\% CR = \frac{[(Ap - Ab_1) - (Am - Ab_2)]}{(Ap - Ab_1)} \times 100 \quad Ec. 2$$

Donde,

Ap = Absorbancia del patrón = 2 mL del radical con 50 µL MeOH.

Ab₁ = Absorbancia del blanco 1 = 2 mL de MeOH.

Am = Absorbancia de la muestra = 2 mL del radical con 50 µL de muestra.

Ab₂ = Absorbancia del blanco 2 = 2 mL MeOH con 50 µL de muestra.

Actividad captadora del radical catiónico ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)].

Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógenos o electrones. La producción del radical se realizó por reacción de volúmenes iguales del ABTS 7mM con persulfato de potasio 2,42 mM, seguido de incubación en oscuridad por 16 h (16). Se mezcló 1 mL de la solución del ABTS^{•+} (Ab₇₃₄ = 0.7) con 100 µL del extracto total de *U. dermestoides* (0,2 mg/mL), la absorbancia de la reacción se leyó a 734 nm cada minuto hasta completar 10 minutos, usando MeOH como blanco. La actividad captadora del radical se calculó usando la ecuación 2, donde:

Ap = Absorbancia del patrón = 1 mL del radical con 100 µL MeOH.

Ab₁ = Absorbancia del blanco 1 = 1 mL de MeOH.

Am = Absorbancia de la muestra = 1 mL del radical con 100 µL de muestra.

Ab₂ = Absorbancia del blanco 2 = 1 mL MeOH con 100 µL de muestra.

El mismo procedimiento se realizó con las fracciones eluidas de la columna Amberlita XAD-2. El control positivo de los ensayos de capacidad captadora de DPPH[•] y ABTS^{•+} fue el antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT) a una concentración de 0,2 mg/mL.

Análisis de datos.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico univariado utilizando medidas de frecuencia, pruebas de tendencia central y de dispersión, usando el paquete estadístico SPSS Statistics 19 para Windows de IBM (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, H, IL, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los compuestos fenólicos son potenciales antioxidantes y captadores de radicales libres. En este estudio se evaluó la presencia de fenoles totales en extractos hidrometanólico de *U. dermestoides*, obteniéndose una concentración de 22,94 ± 0,34 mg AGE/g ES. Adicionalmente, los extractos presentaron actividad captadora de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} mayor a la del antioxidante de referencia BHT, a la misma concentración (0,2 mg/mL) (Tabla 1).

Tabla 1. Capacidad captadora de DPPH[•] y ABTS^{•+} de extractos hidrometanólicos totales de *U. dermestoides* y eluidos de la columna Amberlita XAD-2. ET= Extracto total; F1= eluido con H₂O; F2= eluido con H₂O: MeOH (1:1, v/v); F3= eluido con MeOH; BHT= butil-hidroxitolueno.

Muestra	% CR (Media ± DE)	
	DPPH [•] _{30 min}	ABTS ^{•+} _{10 min}
ET	90,62 ± 1,10	98,11 ± 0,84
F1	15,25 ± 0,07	35,82 ± 2,50
F2	15,83 ± 0,1	47,99 ± 2,38
F3	27,69 ± 0,4	63,20 ± 3,4
BHT	62,80 ± 0,3	71,0 ± 0,15

Las fracciones eluidas de la columna Amberlita XAD-2 presentaron diferencias en el color, F1 fue incoloro, F2 de color naranja y F3 de color rojo (Figura 2), lo cual sugiere una elución diferencial de los compuestos fenólicos, siendo mayor en fracciones eluidas con MeOH (F3). Adicionalmente, F3 presentó mayor actividad captadora de radicales libres, indicando que existe una asociación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del *U. dermestoides*.

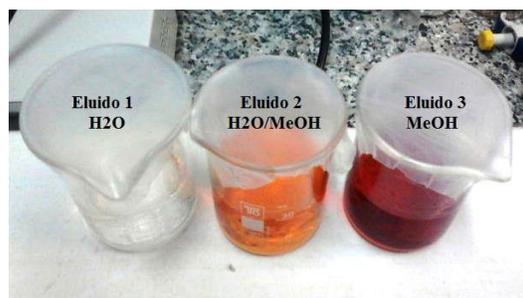


Figura 2. Fracciones fenólicas del extracto hidrometanólico de *U. dermestoides* adultos, separadas con Amberlita XAD-2.

Los resultados con el extracto total de *U. dermestoides* muestran correspondencia entre los ensayos con DPPH[•] y ABTS^{•+}. Por el contrario, cuando se analizaron los resultados con las fracciones F1, F2 y F3, no se observó correspondencia entre los dos métodos, una explicación para esto podría ser el pH ácido de las fracciones. En este sentido, se ha comprobado que la aplicación del

método con DPPH[•] está limitada a condiciones de pH neutras y alcalinas, mientras que el método con ABTS^{•+} es efectivo a un rango amplio de valores de pH (17). Por lo anterior, el pH ácido de las fracciones separadas con Amberlita pudo afectar la reacción con el DPPH[•]. Adicionalmente, el ensayo cinético muestra que la captación del radical ocurre más rápido con el ABTS^{•+}, en comparación con el DPPH[•], obteniéndose el siguiente orden de reacción: ET > F3 > F2 > F1.

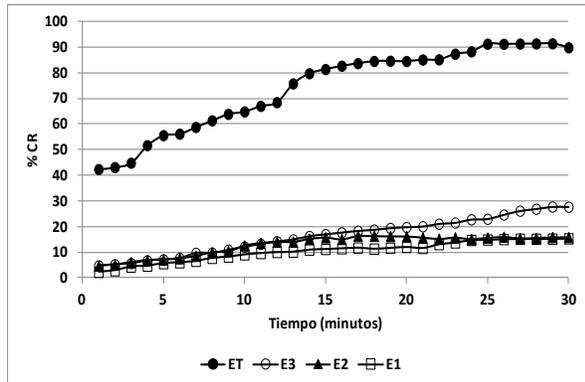


Figura 3. Ensayo cinético de captación del DPPH[•]. ET= Extracto total de *U. dermestoides*; E1, E2 y E3 = fracciones eluidas de la columna Amberlita XAD-2 con H₂O, H₂O: MeOH y MeOH, respectivamente.

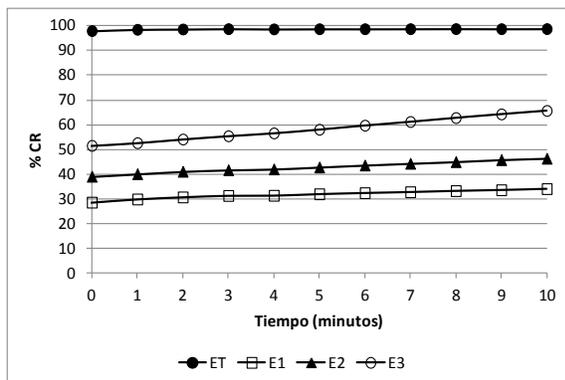


Figura 4. Ensayo cinético de captación de ABTS^{•+}. ET= Extracto total de *U. dermestoides*; E1, E2 y E3 = fracciones eluidas de la columna Amberlita XAD-2 con H₂O, H₂O: MeOH y MeOH, respectivamente.

A pesar de las diferencias en los porcentajes de captación de radicales libres, ambos métodos, DPPH y ABTS, mostraron que los extractos hidrometanólicos de *U. dermestoides*, presentan actividad antioxidante. A la fecha son pocas las investigaciones publicadas que demuestren el efecto antioxidante de insectos comestibles y este es el primer reporte de actividad captadora de radicales libres de extractos del coleóptero *U. dermestoides* y sus fracciones fenólicas. Estudios similares reportaron actividad antioxidante de extractos metanólicos de pupas del escarabajo *Serrognathus platymelus*

castanicolor (18) y extractos etanólicos y acuosos de escarabajos adultos de la especie *Holotrichia parallela* Motschulsky (19). Otras investigaciones se han enfocado en la identificación y aislamiento de proteínas de coleópteros con actividad antioxidante, uno de ellos demostró la presencia de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) en extractos acuosos del escarabajo *U. dermestoides* (20); otro estudio reportó presencia de una proteína antioxidante soluble, en larvas del escarabajo *Zophobas morio* (21).

El efecto anti-inflamatorio atribuido al consumo de *U. dermestoides* podría ser explicado, en parte, por la actividad antioxidante de compuestos fenólicos presentes en el cuerpo del escarabajo. Una investigación previa publicada por nuestro grupo identificó al 4-etil-resorcinol en el extracto metanólico de *U. dermestoides* (22). Se ha reportado que compuestos con grupos sustituyentes hidrofóbicos en la posición C4 del resorcinol son antioxidantes y potentes inhibidores de la actividad tirosinasa, una enzima que cataliza la oxidación de fenoles (23, 24). Por lo anterior se propone que este compuesto podría contribuir al efecto anti-inflamatorio del extracto hidrometanólico del *U. dermestoides*.

Adicionalmente, la mayor actividad captadora de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} del extracto total del escarabajo, indica que otros compuestos no fenólicos contribuyen apreciablemente con el efecto antioxidante.

CONCLUSIONES

Los extractos hidrometanólicos de *U. dermestoides* presentan actividad captadora de radicales libres, lo que estaría relacionado con la presencia de compuestos fenólicos en el extracto. Este resultado sugiere que los escarabajos adultos de *U. dermestoides* podrían usarse como recurso nutracéuticos para aliviar las enfermedades inducidas por estrés oxidativo y como aditivo antioxidante para la industria de los alimentos; sin embargo, se requiere de mayor investigación para identificar los compuestos directamente responsables de la actividad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Costa Neto EM, Ramos-Elorduy J, Pino JM. Los insectos medicinales de Brasil: primeros resultados. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. 2006; 38 (1):395-414.
2. Chu GS, Palmieri JR, Sullivan JT. Beetle-eating: a Malaysia folk medical practice and its public health implications. Trop Geogr Med. 1977; 29 (4): 422 - 427.
3. Costa-Neto EM. The use of insects in folk medicine in the state of Bahia Northeastern Brazil, with notes on insects reported elsewhere in Brazilian folk medicine. Human Ecol. 2002; 30 (2): 245-263.
4. Flores GE, Padín SB, Stetson RE. First records of the Oriental species *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) in Argentina. Rev Soc Entomol Argent. 2002; 61 (3/4): 48-50.
5. Capul-Magaña FG. Sobre el uso de *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878), (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperini) en la coleopteroterapia: informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México. Boln Asoc Esp Ent. 2010; 34 (3-4): 419-422.
6. Dacanay AA, Cervancia CR. Biology of *Palembus (Martianus) dermestoides* Chevrolat (Coleoptera; Tenebrionidae). Philippines Ent. 1989; 7 (5): 471-477.
7. Chacon RE, Villalba V, Moreira I. Descripción anatómica de los órganos genitales y glándulas secretoras abdominales del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (Fairmare 1893) (Coleoptera: Tenebrionidae). Tecnología en Marcha. 2009; 22 (4): 45-65.
8. Garcés AM, Arango GP, Gómez T. Cría de *Ulomoides dermestoides*, coleoptera: tenebrionidae, en tres tipos de sustrato. Rev Lasallista Investig. 2012: 64-68.
9. Santos RC, Lunardelli A, Caberlon E, Bastos CM, Nunes FB, Pires MG, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. Inflammation. 2010; 33 (3):173-179.
10. Crespo R, Villaverde ML, Girotti JR, Güerci A, Juárez MP, de Bravo MG. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. J Ethnopharmacol. 2011; 136 (1): 204-209.
11. Mendoza DL, Saavedra S. Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). Vitae. 2013; 20(1): 41-48.
12. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. BioFactors. 1997; 6(4): 391-397.
13. Ozgen M, Wyzgoski F, Tulio A Jr. Antioxidant capacity and phenolic antioxidants of Midwestern black raspberries grown for direct markets are influenced by production site. Horticulture science. 2008; 43(7): 2039-2047.
14. Osler KH, Goodwin R. A general use of Amberlite XAD-2 resin for the purification of flavonoids from aqueous fractions. J Nat Prod. 1983; 47(1):188.
15. Goyal AK, Middha SK, Sen A. Evaluation of the DPPH radical scavenging activity, total phenols and antioxidant activities in Indian wild *Bambusa vulgaris* "Vittata" methanolic leaf extract. J Nat Pharm 2010; 1:40-45.
16. Aubad P, Rojano B, Lobo T. Actividad antioxidante en musgos. Scientia Et Technica. 2007; 13 (033): 23-26.
17. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005; 53:4290-4302.
18. Suha H, Kimb S, Hwangb J, Kimc M, Kim I. Antioxidant activity of aqueous methanol extracts from the lucanid beetle, *Serrognathus platymelus castanicolor* Motschulsky (Coleoptera: Lucanidae). J Asia Pac Entomol. 2011; 14 (1): 95-98.
19. Liu S, Sun J, Yu L, Zhang C, Bi J, Zhu F. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. Food Chem. 2012; 134(4):1885-1891.
20. Long D, Defu C, Beibei Z., Xiao Can L, Jia Y. Optimization of extraction conditions for superoxide dismutase from *Martianus dermestoides*. Journal of Northeast Forestry University. 2009; 37(4): 69-70, 73.
21. Zhang J. Isolation, purification and antioxidant activity evaluation of water soluble protein from Giant Mealworm Beetle (*Zophobas morio*) larvae. Food Sciencie. 2011; 32 (18): 30-33.

22. Mendoza DL, Salgado M, Durant L. Capacidad antioxidante de extractos metanólicos de cuerpo entero del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878). *Rev Cub Invest Biomed.* 2013; 32(4): 402-410.
23. Kuniyoshi S, Ryuichiro K, Kokki S. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations. *Planta Med.* 2000; 66(1): 11-15.
24. Te-Sheng C. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009; 10: 2440-2475.