



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y ALIMENTARIAS

**EFECTO PROTECTOR DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS SOBRE
COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR: UN ENFOQUE EN LA
FOTOPROTECCIÓN DE LA PIEL**

**Trabajo de grado para optar al título de magister en ciencias farmacéuticas y
alimentarias**

LUISA FERNANDA DUQUE BETANCUR

Tutor

Dr. Edison Javier Osorio Durango

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACEUTICAS Y ALIMENTARIAS

ÁREA: BIORGÁNICA Y PRODUCTOS NATURALES

MEDELLIN - COLOMBIA

2016

AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco a Dios, por las bendiciones con las que día a día me ha llenado.

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

Al sistema general de regalías y a la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural del departamento de Antioquia por la financiación del proyecto 4600001046, por medio del cual obtuve mis gastos de manutención y se financiaron parte de los equipos, materiales e insumos requeridos para la satisfactoria culminación de esta investigación.

Al programa de Maestría en ciencias Farmacéuticas y Alimentarias por contribuir en mi formación académica.

A los miembros del comité tutorial el Dr. Julián Londoño y a McS. Jhon Jairo Vallejo, por sus aportes en esta investigación.

Al profesor Edison Osorio, por permitirme pertenecer a la familia GISB, por su confianza, su apoyo, sus aportes, su constante dedicación y su acompañamiento, dándome la oportunidad de crecer académica, personal y laboralmente en un grupo de tan alto nivel ...Gracias totales!

Mi más sincero agradecimiento a los integrantes del Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, porque durante todo este proceso me ayudaron a formar no solo profesional y académicamente, sino como persona. A mis compañeros Charlotte, Lucho, Cami, Cata, Monty, Lara, Karent, Diana, Malón, Gio, Rafa y Nora agradezco infinitamente su acompañamiento, su ayuda y paciencia. Especialmente quisiera agradecer a Ana, por las tardes de tinto y por ayudarme y acompañarme de manera tan divertida durante todo este proceso. A todos ustedes de verdad mil gracias, hicieron todo más ameno...

A la Dra. Karent Bravo, infinitas gracias por su asesoramiento y completa colaboración en el desarrollo de esta investigación. A Daniel Carvajal por ayudarnos a poner los cimientos sobre los análisis estadísticos en esta investigación.

Finalmente quisiera agradecer a las personas más importantes de mi vida, y que más han influido en quien soy ahora.

A mis hermanas Sandra y Daniela, gracias por estar siempre, por el amor y el apoyo.

A Alejandro, mi corazón... que llegaste del pasado a cambiarme la vida y hacerme de cada uno de mis días los mejores días de la vida. Gracias por tu compañía y por tu amor.

Y a mi mamá y mi papá, por ser el motor que impulsan mis días, por el apoyo y los sacrificios que han hecho para que saliera adelante. Por todo ese amor y confianza depositada en mí, éste y todos mis logros son por ustedes y para ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

1	CAPITULO I. EL FOTOENVEJECIMIENTO DE LA PIEL: MECANISMOS Y ESTRATEGIAS PARA DESACELERAR SU PROGRESIÓN	19
1.1	Introducción	19
1.2	Estructura y funciones de la piel	19
1.2.1	Estructura de la piel	20
1.2.1.1	Epidermis	21
1.2.1.2	Dermis	25
1.2.1.3	Hipodermis	27
1.2.1.4	Vascularización cutánea	27
1.2.1.5	Inervación cutánea.	28
1.2.1.6	Sistema inmune de la piel	28
1.2.2	Funciones de la piel.	29
1.2.2.1	Función Barrera	29
1.2.2.2	Función de protección	29
1.2.2.3	Función inmunológica	29
1.2.2.4	Función secretora	30
1.2.2.5	Función de termorregulación	30
1.2.2.6	Funciones de sensibilidad	31
1.2.2.7	Función de absorción.	31
1.2.2.8	Síntesis de vitamina D	31
1.3	El envejecimiento de la piel	32
1.3.1	Envejecimiento intrínseco	32
1.3.2	Envejecimiento extrínseco	33
1.3.3	Fotoenvejecimiento	34
1.3.3.1	Morfología de la piel expuesta a radiación UV	35
1.3.3.2	Especies reactivas de oxígeno inducidas por UV	35

1.3.3.3	Señales de transducción inducidas por radiación UV en piel humana	36
1.3.3.4	Expresión de MMP's mediada por AP-1	38
1.3.3.5	Efectos de la radiación UV en el ácido hialuronico y la elastina	40
1.3.3.6	Daño al DNA y mutación en la piel	40
1.3.3.7	Daño mitocondrial	41
1.4	Fotoenvejecimiento: Prevención y tratamiento	41
1.4.1.1	Prevención y tratamiento para el fotoenvejecimiento de la piel	42
1.4.2	Compuestos bioactivos de origen natural usados contra el envejecimiento de la piel	43
1.5	Cadena de plantas aromaticas, medicinales, condimentariás y afines -PAMCyA- 48	
2	CAPITULO II. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIENVEJECIMIENTO DE ESPECIES AROMATICAS Y MEDICINALES	50
2.1	MATERIALES Y METODOS	51
2.1.1	Obtención de material vegetal	51
2.1.2	Preparación de extractos vegetales	51
2.1.3	Determinación de la actividad antioxidante	52
2.1.3.1	Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT)	52
2.1.3.2	Capacidad de absorción de radicales de oxigeno (ORAC)	52
2.1.3.3	Poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP)	53
2.1.4	Determinación de las propiedades anti-envejecimiento.	53
2.1.4.1	Actividad anti-colagenasa	54
2.1.4.2	Actividad anti-elastasa	54
2.1.4.3	Actividad anti-hialuronidasa	55
2.1.5	Análisis estadístico	56
2.2	Resultados y discusión.	56

2.2.1	Propiedades antioxidantes.	60
2.2.1.1	Contenido de polifenoles totales	60
2.2.1.2	Capacidad de absorción de radicales oxígeno -Valor ORAC	61
2.2.1.3	Poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP)	64
2.2.2	Propiedades antienvjecimiento	65
2.2.3	Ponderación de actividades y selección de especies biológicamente más activas	69
3	CAPITULO III. EFECTO FOTOPROTECTOR DE PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES SELECCIONADAS SOBRE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS	74
3.1	Materiales y métodos	75
3.1.1	Cultivo de fibroblastos dérmicos humanos y tratamiento con los extractos de <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>S. sonchifolius</i>	75
3.1.2	Irradiación UVB	75
3.1.3	Ensayos de viabilidad celular	76
3.1.4	Determinación de la producción de MMP-1 mediante kit ELISA	76
3.1.5	Determinación de la producción de pro-colágeno tipo I mediante ELISA	77
3.1.6	Detección de la generación de ROS intracelular	77
3.1.7	Análisis estadístico	78
3.2	Resultados y discusión	78
3.2.1	Efecto de los extractos sobre la viabilidad de fibroblastos dérmicos humanos	78
3.2.2	Determinación del efecto fotoprotector de los extractos <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y hojas de <i>S. sonchifolius</i> sobre HDF sometidos a radiación UVB	81
3.2.2.1	Efecto de la radiación UVB sobre la producción de MMP-1 en HDF	82
3.2.2.2	Efecto de los extractos de <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>S. sonchifolius</i> sobre la producción de MMP-1 en HDF estimulados con radiación UVB	84
3.2.2.3	Efecto de la radiación UVB sobre la producción de procolageno tipo Iα1 en HDF	85

3.2.2.4	Efecto de los extractos de <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>S. sonchifolius</i> sobre la producción de pro-colageno tipo I α 1 en HDF estimulados con radiación UVB	87
3.2.2.5	Efecto de la radiación UVB sobre la producción de ROS en HDF	89
3.2.2.6	Efecto de los extractos de <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>S. sonchifolius</i> sobre la producción de ROS inducido por UVB en HDF	91

4 CAPITULO IV. CARACTERIZACIÓN QUIMICA E IDENTIFICACIÓN TENTATIVA DE METABOLITOS BIOACTIVOS FOTOPROTECTORES 95

4.1 Materiales y Métodos 96

4.1.1	Material vegetal y elaboración de extractos	96
4.1.2	Material de referencia empleado	96
4.1.3	Preparación de muestras	96
4.1.4	Análisis cromatográfico de los extractos mediante HPLC-DAD-MS	97
4.1.5	Análisis multivariado de datos e identificación tentativa de potenciales metabolitos responsables de las actividades biológicas evaluadas	97

4.2 Resultados y discusión. 98

4.2.1	Caracterización de <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>S. sonchifolius</i> mediante HPLC-DAD-MS	98
4.2.1.1	Fingerprint <i>Rosmarinus officinalis</i>	101
4.2.1.2	Fingerprint <i>Thymus vulgaris</i>	107
4.2.1.3	Fingerprint <i>Smallanthus sonchifolius</i>	112
4.2.2	Determinación de posibles metabolitos responsables de las actividades antioxidante y antienvjecimiento de las especies <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>S. sonchifolius</i>	114
4.2.2.1	Análisis de componentes principales PCA	115
4.2.2.2	Análisis multivariado aplicados a la determinación de metabolitos responsables de las propiedades antioxidantes y antienvjecimiento	117
4.2.3	Actividad anti-colagenasa	119
4.2.4	Actividad anti-elastasa.	121

4.2.5	Actividad anti-hialuronidasa	122
4.2.6	Propiedades antioxidantes de los extractos <i>R. officinalis</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>S. sonchifolius</i>	126
5	CONCLUSIONES	131
6	BIBLIOGRAFÍA	133

RESUMEN

La piel se encuentra expuesta a una serie de compuestos y agentes tóxicos causantes y/o catalizadores de una serie de patologías como lo es el fotoenvejecimiento y cuya progresión es debida principalmente a la exposición a la radiación UV. Durante este proceso se presenta un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y subsecuentemente una cascada de reacciones inducen la producción de metaloproteinasas (MMPs) y enzimas que degradan las macromoléculas de la matriz extracelular como el colágeno, la elastina y el ácido hialurónico, y se encargan de inhibir la síntesis de pro-colágeno. Éste trabajo busca potenciales fuentes naturales como agentes fotoprotectores, para lo cual se emplearon extractos de diversas especies de plantas medicinales y aromáticas seleccionadas bajo parámetros químicos y biológicos. Se determinó la capacidad antioxidante a través de los métodos ORAC, FRAP y Contenido de Polifenoles Totales (CPT), y la actividad inhibitoria de enzimas relacionadas con el proceso de envejecimiento como colagenasa, elastasa e hialuronidasa. Se determinó que las especies *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Smallanthus sonchifolius* presentaron las actividades anti-envejecimiento y antioxidantes más destacadas. Con las especies más activas se realizó la evaluación sistemática de su efecto fotoprotector, mediante la medición de niveles de MMPs, pro-colágeno y la actividad moduladora en cuanto a la producción de ROS intracelular en fibroblastos dérmicos humanos (HDF) estimulados con radiación UVB. En la determinación de los metabolitos responsables de la actividad biológica, se realizó un estudio quimiométrico y la identificación tentativa se realizó bajo un método en HPLC-DAD-MS usando estándares de referencia. Las especies *R. officinalis*, *T. vulgaris*, y *S. sonchifolius* presentan una interesante capacidad antioxidante y actividad inhibitoria de las enzimas anti-envejecimiento, además de afectar la producción de MMP's y de ROS e incrementar el pro-colágeno en HDFa. Mediante el uso de herramientas estadísticas como análisis de componentes principales análisis multivariados de discriminación y similaridad, apoyados de la caracterización química de los extracto mediante perfiles cromatográficos, se determinaron algunas señales que se encuentran altamente correlacionadas con las actividades anti-envejecimiento evaluadas. Los resultados

postulan que las especies aromáticas y medicinales son potenciales fuentes de ingredientes anti-envejecimiento. Además, el uso de metodologías analíticas en combinación con estrategias estadísticas, permite obtener una posible determinación de correlaciones de los metabolitos y su bioactividad. Lo cual es un paso clave en el desarrollo de extractos optimizados con base en su química y/o actividad para ser incorporados en la industria cosmética.

Palabras clave: Fotoprotección, matriz extracelular, radiación UV, análisis multivariado, plantas aromáticas y medicinales.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la piel.

Figura 2. Componentes celulares y extracelulares de la piel.

Figura 3: Representación esquemática de la influencia de ROS, producida por la radiación UV, sobre el envejecimiento cutáneo.

Figura 4. Rutas bioquímicas asociadas con el envejecimiento intrínseco y extrínseco.

Figura 6. Registro fotográfico de especies colectadas, momento de corte y productores involucrados con el suministro del material vegetal.

Figura 7. Ponderación gráfica de las pruebas biológicas evaluadas.

Figura 8. Componentes principales extractos y pruebas biológicas.

Figura 9. Efectos de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* sobre la Viabilidad celular.

Figura 10. Efecto de la radiación UVB en la viabilidad celular de HDF.

Figura 11. Efecto de la radiación UVB en la producción de MMP-1 en HDF.

Figura 12. Efecto de los extractos sobre la producción de MMP-1 en HDF estimulados con UVB.

Figura 13. Efecto de la radiación UVB en la producción de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ en HDF.

Figura 14. Efecto de los extractos sobre la producción de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ en HDF estimulados con UVB.

Figura 15. Efecto de la radiación UVB sobre la producción de ROS en HDF.

Figura 16. Efecto de los extractos R4, T4 y HY5 sobre la producción de ROS inducida por UVB en HDF.

Figura 17. Estructuras de estándares usados para la detección en extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*.

Figura 18. Cromatograma mix de estándares 50 ppm a 280 nm.

Figura 19. Cromatogramas representativos a 280 nm de los extractos de *R. officinalis*

Figura 20. Cromatogramas mediante LC-MS de R4.

Figura 21. Ion extraído en R4 del M-H de compuestos que se reportan en extractos de *R. officinalis*.

Figura 22. Cromatogramas representativos a 280 nm de los extractos de *T. vulgaris*.

Figura 23. Cromatogramas mediante LC-MS para T4.

Figura 24. Fingerprint de extractos *S. sonchifolius*.

Figura 25. Fingerprint HY5 LC-MS.

Figura 26. Análisis de componentes principales de los 21 extractos pertenecientes a las especies *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*.

Figura 27. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad anti-colagenasa.

Figura 28. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad anti-elastasa.

Figura 29. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *sonchifolius* con base en la actividad anti-hialuronidasa.

Figura 30. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *sonchifolius* con base en la actividad antioxidante (ORAC).

Figura 31. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad antioxidante (FRAP).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas y metabolitos secundarios asociados con propiedades anti-envejecimiento.

Tabla 2. Metabolitos secundarios y algunas propiedades farmacológicas reportadas para las especies seleccionadas.

Tabla 3. Propiedades antioxidantes y porcentaje de ponderación de plantas aromáticas y medicinales.

Tabla 4. Propiedades anti-envejecimiento expresado en términos de % de inhibición, porcentajes de ponderación.

Tabla 5. Coeficientes de correlación de Pearson CPT vs ORAC, FRAP, colagenasa, elastasa e hialuronidasa.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande y extenso que posee el cuerpo humano tanto en superficie como en peso. Su principal función consiste en servir como barrera protectora física entre el ambiente y los órganos internos, prevenir la pérdida desmedida de líquidos y electrolitos, reducir la penetración de agentes químicos y proteger contra agentes patógenos externos. Además es indispensable para el proceso de termorregulación y se constituye como la primera barrera inmunológica del cuerpo^{1,2}. Para cumplir con las anteriores funciones, la piel se encuentra organizada en tres capas de diferente composición celular: la epidermis la cual es la capa más externa de la piel y está compuesta principalmente de queratinocitos; la dermis que es la capa más gruesa de la piel, se encuentra conformada por fibroblastos encargados de sintetizar la sustancia fundamental y los componentes de la matriz extracelular (ECM) como colágeno, elastina, fibronectina y glicosaminoglicanos, que en principio son la base estructural y funcional de la piel; y la capa más interna, la hipodermis, constituida principalmente por adipocitos³. La piel es un componente importante de belleza externa y es el foco de procedimientos cutáneos para revertir principalmente los cambios visibles tanto físicos como funcionales que se observan con el paso del tiempo, en un proceso conocido como envejecimiento cutáneo.

El envejecimiento de la piel es un proceso biológico complejo que afecta varias de sus capas, observando un mayor daño en el tejido conectivo de la dermis debido a la acumulación de elastina degradada y desorganizada y la pérdida de colágeno intersticial². Las causas del proceso del envejecimiento han sido divididas en dos categorías principales: las del envejecimiento intrínseco y las del envejecimiento extrínseco⁴. El intrínseco o natural es debido a cambios en la elasticidad de la piel con el paso del tiempo como una unión de factores como predisposiciones genéticas y a una serie de mecanismos que disminuyen el número, capacidad de biosíntesis de fibroblastos y una reducción en la cantidad de elastina

y colágeno en la dermis. Mientras que el envejecimiento extrínseco se debe a factores ambientales como la exposición a la radiación ultravioleta (UV), a diferentes estilos de vida como dieta, sueño, consumo de alcohol o cigarrillo y afecciones de salud en general. Sin embargo se ha sugerido que alrededor del 80% de los cambios visibles debido al envejecimiento de la piel se atribuye únicamente a la exposición solar^{2,5}. Tanto la radiación UV-B (290-320 nm) como la UV-A (320-400 nm), son responsables del envejecimiento de la piel. Sin embargo la UV-B genera efectos biológicos 1000 veces más fuertes que los generados por la UV-A. Esta radiación es absorbida en su mayoría por la epidermis y afecta principalmente las células epidérmicas, aunque solo cerca del 10-30% de la radiación UV-B puede penetrar hacia la dermis y afectar los fibroblastos y la ECM⁶. Cuando la radiación UV es absorbida por la piel, se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)^{1,7}, lo que conlleva a un incremento del estrés oxidativo y generación de daños a membranas y proteínas esenciales de las células. Las ROS además de actuar como señalizadores moleculares, pueden causar peroxidación lipídica, daño a la mitocondria y al ADN y modificación de expresión en genes y proteínas. Así mismo, las ROS pueden iniciar vías moleculares complejas que incluyen la activación de enzimas como las metaloproteinasas colagenasa (MMP-1), la serina-proteasa elastasa y la glicosidasa hialuronidasa, las cuales degradan los componentes de la ECM⁸. Por si fuera poco, estudios bioquímicos han revelado que durante el proceso de fotoenvejecimiento, se reducen los precursores de colágeno tipo I y III (COL1A1 y COL1A2). Debido a la aceleración de la degradación y/o disminución de la síntesis de fibras de colágeno, y a la inducción y activación de metaloproteinasas de la matriz (MMP) encargadas de degradar los componentes de la ECM como el colágeno y la elastina, se observan cambios visibles en la piel como pérdida de fuerza, elasticidad, humectación y resiliencia generando arrugas y cambios en el espesor de la piel^{6,9}.

Teniendo en cuenta que la piel perfecta es la característica humana universalmente más deseada, es la carta de presentación ante la sociedad y muestra de nuestra salud y bienestar corporal¹⁰, en la actualidad y a nivel mundial, los productos para el cuidado de la piel presentan una gran demanda y el mercado crece de manera exponencial. Para el año 2014 el

mercado de estos productos ascendió a los \$111 billones y se proyecta exceder los \$131 billones para el año 2019¹¹ con mercados crecientes en Asia y Latinoamérica¹². Entre los productos para el cuidado de la piel, los productos antienvjecimiento han tenido un importante crecimiento en la industria cosmética posicionándose como el mercado de mayor auge con un crecimiento anual del 7.8%¹³. Entre los productos antienvjecimiento, aquellos con ingredientes de origen natural han tomado fuerza en el mercado y la industria cosmética, principalmente por la percepción del consumidor sobre los ingredientes de origen natural que simbolizan seguridad y eficacia, contrario a los productos de origen sintético. Por tanto no es de extrañar la necesidad de productos nuevos, innovadores y seguros^{14,15}.

Las plantas y sus metabolitos secundarios han sido usados en la industria cosmética para la obtención de ingredientes naturales como agentes antioxidantes, fotoprotectores, antienvjecimiento, entre otros. Estudios científicos han demostrado que compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides, y otros compuestos polifenólicos, especialmente aquellos de alto peso molecular obtenidos de plantas, presentan propiedades fotoprotectoras que son capaz de aminorar los efectos adversos de la radiación UV mediante diversos mecanismos como la regulación de ROS e inhibición de MMP's, presentándose como agentes beneficiosos para el cuidado de la piel^{2,8,16-19}. Además, aparte de su uso culinario, las plantas aromáticas y medicinales son reconocidas por sus propiedades terapéuticas. Muchas de estas especies poseen una gran variedad de metabolitos secundarios tipo polifenoles como derivados ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, entre otros²⁰⁻²⁵, de los cuales existen reportes sobre sus propiedades antioxidantes, fotoprotectoras y antienvjecimiento^{2,19,26-28}. Por la anterior, las plantas aromáticas y medicinales se presentan como un blanco potencial en la búsqueda de ingredientes naturales viables para la industria cosmética enfocadas en los productos antienvjecimiento con propiedades fotoprotectoras. Al respecto, en Colombia la cadena de plantas aromáticas medicinales, condimentarías y afines –PAMCyA- se constituye como una cadena productiva de alto impacto económico con exportaciones de \$31.9 millones para el año 2013, y se presenta como un subsector productivo priorizado por la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural del departamento de Antioquia en la elaboración de productos de alto valor agregado²⁹.

Con base en un estudio bibliográfico sobre las 19 especies pertenecientes a la PAMCyA priorizadas por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural para el departamento de Antioquia, se seleccionaron siete de ellas para realizar un estudio de su efecto fotoprotector sobre cultivos celulares de fibroblastos dérmicos humanos, evaluar su potencial antioxidante y la inhibición enzimática sobre algunas MMP y glicosidasas que se encuentran involucradas en el proceso de fotoenvejecimiento. Igualmente se pretende mostrar un enfoque integrado y dirigido a la determinación de los posibles metabolitos bioactivos mediante la evaluación de actividades biológicas y la caracterización química, apoyados en estudios estadísticos y quimiométricos.

Este trabajo consta de cuatro capítulos, el primero relacionado con el enfoque y conocimiento teórico y bibliográfico sobre la piel, su estructura, principales componentes, estructura y función biológica enfocado en el proceso del fotoenvejecimiento. Posterior a la revisión bibliográfica se procede con el tamizaje de siete especies seleccionadas de la cadena PAMCyA priorizadas en Antioquia: *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Artemisia dracuncululus*, *Caléndula officinalis*, *Vaccinium meridionale* *Matricaria chamomilla*, y *Smallanthus sonchifolius* basados en la evaluación de actividades antioxidantes y de inhibición de enzimas relacionadas con el proceso de fotoenvejecimiento, resultando en un estudio final de ponderación y análisis de componentes principales que permite la identificación de especies altamente promisorias con base en las actividades presentadas. Una vez sugeridas las especies promisorias se procede con el tercer capítulo, el cual se basa en ensayos dirigidos en la protección de la ECM evaluando el efecto sobre diversos procesos durante el fotoenvejecimiento como lo es la producción de MMP-1, pro-colágeno tipo I α 1 y ROS, usando la línea celular de fibroblastos dérmicos humanos HDFa estimulados con radiación UVB. La identificación tentativa de moléculas responsables de las actividades observadas se presenta en el cuarto capítulo. Para ello se realizó la caracterización química usando HPLC-DAD-MS y una serie de estándares de referencia; finalmente mediante técnicas quimiométricas como lo es el PCA y PLS-DA se postulan una serie de compuestos a partir de las correlaciones entre las actividades y los perfiles químicos, generando un

estudio integrado basado en la caracterización química y bioactividades de especies de plantas cultivadas en el Oriente Antioqueño.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto protector sobre la matriz extracelular de extractos de plantas aromáticas, medicinales, condimentarías y afines (PAMCyA) cultivadas en el oriente Antioqueño, a través de diversos mecanismos fotoprotectores.

Objetivos específicos.

1. Establecer el potencial de protección *in vitro* sobre la matriz extracelular mediante ensayos enzimáticos y antioxidantes de extractos de siete especies PAMCyA.
2. Evaluar la actividad protectora de las especies con mayor actividad antioxidante y enzimática sobre la matriz extracelular, empleando líneas celulares de fibroblastos dérmicos.
3. Caracterizar químicamente las especies que presentan mayor actividad protectora sobre la matriz extracelular mediante HPLC-DAD-MS.
4. Determinar la posible correlación existente entre las actividades enzimáticas, celulares y antioxidantes y los metabolitos encontrados en las especies que presentan mayor actividad.

1 CAPITULO I

EL FOTOENVEJECIMIENTO DE LA PIEL: MECANISMOS Y ESTRATEGIAS PARA DESACELERAR SU PROGRESIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande que posee el ser humano, y tiene como función la de servir de barrera protectora contra agentes externos que pueden ser altamente nocivos para nuestra salud. Sin embargo, se encuentra expuesta constantemente a un sinnúmero de patógenos y procesos que causan lesiones y cambios en la piel. Entre estos procesos tenemos el fotoenvejecimiento, un tipo de envejecimiento causado principalmente por la exposición a la radiación ultravioleta (UV). El fotoenvejecimiento puede generar cicatrices profundas y cambios drásticos en la estructura funcional de la piel. En éste capítulo se hace una revisión de la estructura y funciones de la piel, así como del daño que la exposición a la radiación UV genera en su matriz funcional. Además, se muestran algunos metabolitos, y plantas que han demostrado servir en la desaceleración de éste proceso mediante diversos mecanismos.

1.2 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA PIEL

La piel - la interface del organismo con el ambiente - es el órgano más largo y extenso que posee el cuerpo humano. En promedio un adulto sano puede tener entre 170-200 cm² y puede pesar entre 15 a 17 kg (aunque esto puede variar dependiendo de la altura y las y el peso)³⁰. El grosor de la epidermis, la capa externa de la piel, puede medir desde 0.5 mm en las áreas

delgadas como los párpados hasta 4-6 mm en los puntos más gruesos como en las plantas de los pies. Tiene la función de actuar como barrera protectora frente a agentes externos, por tanto, es la frontera de contacto con nuestro entorno. Además es la encargada de controlar la pérdida de agua o calor en nuestro cuerpo y su apariencia es una de las principales evidencias de salud y estilo de vida.

1.2.1 Estructura de la piel

La piel es un órgano complejo que alberga poblaciones de distintos tipos de células organizadas en tres grandes capas sobrepuestas entre sí. La capa más externa de la piel es la epidermis, una estructura estratificada que es formada por las células madre localizadas en la capa basal y actúa como la primera barrera protectora entre el ambiente y el organismo. Esta capa se sobrepone a la dermis mediante la unión dermoepidérmica cuyo elemento principal es la membrana basal y es la encargada del soporte mecánico de la epidermis. La dermis es la capa más gruesa de la piel y está constituida principalmente por fibroblastos encargados de producir los componentes de la matriz extracelular (ECM) entre los cuales se encuentran el colágeno, elastina, proteoglicanos y fibronectinas que dan el soporte a la dermis. Por último bajo la dermis se encuentra la hipodermis que actúa como un colchón de grasa protector para el aislamiento y depósito de energía compuesto principalmente de adipositos^{30,31} (Figura1). A continuación, se describirá cada una de las capas que conforman la piel, su constitución y contribución a la fisiología cutánea.

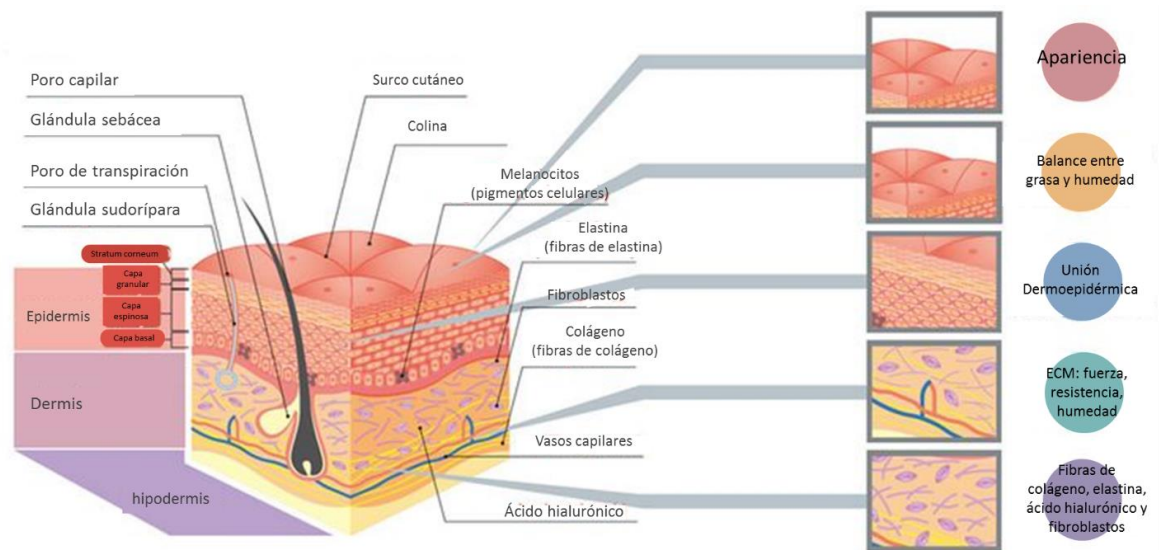


Figura 1. Estructura de la piel³²(modificado).

1.2.1.1 Epidermis

La epidermis está conformada por cuatro clases de células: los queratinocitos corresponden al 95% de la población celular mientras que los melanocitos, Langerhans y las células de Merkel corresponden a un 5%. Estas células se unen fuertemente para conformar las 4 capas de la epidermis: stratum corneum, capa granular, capa espinosa y capa basal, respectivamente, desde la parte externa hasta la más interna. La capa basal o unión dermoepidérmica, es la encargada de hacer el anclaje con la dermis (Figura 2).

1.2.1.1.1 Queratinocitos

Los queratinocitos son las células predominantes en la epidermis. Deben su nombre a la proteína que producen durante el curso de su vida, la queratina que cumple unas funciones específicas e importantes en la piel. Su estructura química permite a la piel adquirir resistencia contra ataques ambientales y la impermeabilidad a ciertas sustancias. Los queratinocitos se forman, crecen y mueren dirigidos hacia la parte externa de la epidermis y a medida que van madurando adquieren características morfológicas propias. Éste proceso es conocido como renovación celular epidérmica³⁰.

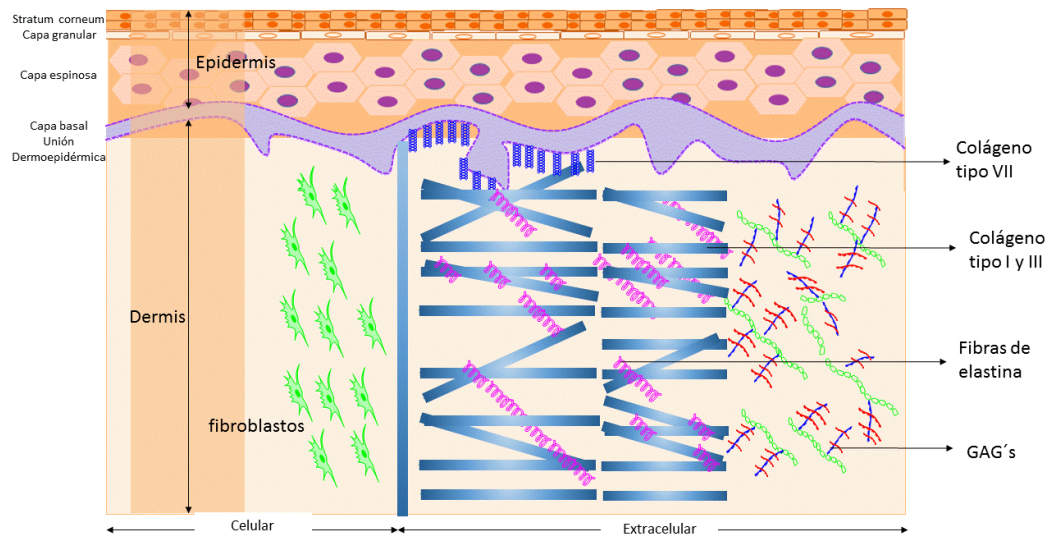


Figura 2. Componentes celulares y extracelulares de la piel³³ (modificado).

1.2.1.1.2 Melanocitos.

Interpuestos entre los queratinocitos de la capa basal se encuentran los melanocitos, células encargadas de sintetizar la melanina, el pigmento responsable del color de la piel. El número de melanocitos puede variar de acuerdo al área del cuerpo y usualmente son proporcionales al número de queratinocitos en una relación de 1 a 5 hasta 1 a 10. Con el fin de cumplir con su función (síntesis de melanina), los melanocitos poseen una estructura celular muy característica, poseen extensiones largas y delgadas llamadas dendritas que comienzan en la membrana citoplasmática, éstas se filtran entre los queratinocitos en la capa basal y espinosa.

Mediante la estimulación de los rayos UV, los melanocitos comienzan a producir melanina, la cual es absorbida en organelas citoplasmáticas llamadas “melanosomas”. De ésta manera los melanocitos distribuyen los melanosomas a todos los queratinocitos adyacentes usando las dendritas celulares como medios de transporte. El pigmento melanina encapsulado en los melanosomas pasa a través de la membrana celular del melanocito y penetran los queratinocitos contiguos. En los queratinocitos los melanosomas se posicionan alrededor de núcleo formando una defensa contra los rayos UV. Así, la distribución de melanina desde los melanosomas a los queratinocitos es la responsable del fenómeno de pigmentación durante la exposición al sol.

1.2.1.1.3 Células de Langerhans

Estas células están situadas sobre la capa basal y como los melanocitos, poseen una apariencia dendrítica. A diferencia de los otros dos tipos de células descritos hasta ahora en la epidermis, las células de Langerhans son visibles bajo el microscopio solo cuando son coloreadas. Su función específica es de inmunocompetencia, es decir, pertenecen al sistema de defensa del organismo que desencadena una rápida respuesta frente al ataque de algunos agentes al organismo humano. Los procesos dendríticos de las células de Langerhans, reciben los antígenos depositados sobre la piel, los procesan y los presentan a los linfocitos T para la activación de la respuesta inmune. La población de éstas células incrementa cuando hay una reacción alérgica y disminuye durante el envejecimiento y la exposición crónica a la radiación UV, hecho que tiene un papel importante en el desarrollo del carcinoma cutáneo en individuos de edades avanzadas y con exposiciones prolongadas al sol³⁴.

1.2.1.1.4 Células de Merkel

Estas células se encuentran principalmente en áreas del cuerpo como la mucosa oral, las huellas digitales, labios y los folículos pilosos. Son fácilmente visibles en un microscopio electrónico y siempre están asociados con la fibra nerviosa. Por esta razón, las células de Merkel son consideradas como “los receptores táctiles”.

1.2.1.1.5 Capa basal

La capa basal está compuesta por una sola línea de células cilíndricas que se encuentran altamente empaquetadas y adheridas a la membrana basal. Estas células muestran una intensa actividad metabólica debido a su rápida división. Son conocidas como las células “padre” de los queratinocitos epidérmicos y gracias a su continua división son aptas para reemplazar toda la superficie celular que es continuamente perdida por la exfoliación.

1.2.1.1.6 Capa espinosa

Situada sobre la capa basal, está formada por muchas capas de células poligonales (a medida que los queratinocitos maduran van adquiriendo una forma aplanada). En este punto las células ya han comenzado a sintetizar queratina, la cual como se mencionó previamente es

la proteína estructural de la epidermis. La estructura química de ésta proteína hace posible ciertas funciones fundamentales de la piel como la resistencia a ataques ambientales y la impermeabilidad a sustancias con las cuales hacemos contacto.

1.2.1.1.7 Capa granular

Se encuentra dispuesta sobre la capa espinosa y está compuesta por varias líneas de células poligonales, pero aplanadas. Los queratinocitos contienen gránulos en su citoplasma (a lo cual hace corresponder el nombre de capa granular). Éstos gránulos son agregados de queratina producida en grandes cantidades por los queratinocitos en ésta capa. A medida que los queratinocitos maduran, van cambiando su morfología y su función, y se presenta una mayor producción de queratina, pero son más planos y van perdiendo su forma regular.

1.2.1.1.8 Capa lúcida

Se forma por uno o dos estratos de queratinocitos, los cuales son planos, no presentan núcleo u otras organelas citoplasmáticas pero contienen una sustancia llamada “eleidin”. Ésta capa se encuentra solo en ciertas áreas de la piel, donde la epidermis es más gruesa como en la palma de las manos y las plantas de los pies.

1.2.1.1.9 Stratum corneum

En esta capa los queratinocitos son llamados “corneocitos” y poseen unas características particulares. Éstos han perdido completamente su actividad metabólica (debido a la pérdida de núcleo y organelas citoplasmáticas), contienen grandes cantidades de queratina, y poseen una estructura celular singular, en forma de hojas yuxtapuestas una sobre la otra.

1.2.1.1.10 Unión dermoepidérmica

La unión dermoepidérmica es una membrana basal compleja, sintetizada por fibroblastos dérmicos y queratinocitos basales. Desempeña un papel fundamental como un soporte mecánico para la adherencia de la epidermis a la dermis y regula los intercambios de productos metabólicos entre estas dos capas, además sirve como un soporte para la migración de queratinocitos durante la cicatrización de heridas y es atravesada por células del sistema

inmune como las células de Langerhans y linfocitos durante procesos de reacción inmunológica o inflamatoria. Hasta ahora han sido caracterizadas alrededor de 20 macromoléculas³⁵, entre las cuales se encuentran la plectina, integrinas, colágeno, lamininas y proteoglicanos.

1.2.1.2 Dermis

La dermis, también conocida como Corium, es un tejido que brinda soporte a la piel, compresible, elástico y protector de la epidermis. Se compone principalmente de fibroblastos encargados de producir una serie de macromoléculas fibrosas y una sustancia fundamental, pero también se encuentran otras células como mastocitos, linfocitos e histocitos, los cuales se encuentran estrechamente relacionados con la respuesta inmune. Constantemente las macromoléculas se están regenerando debido a un proceso de degradación y biosíntesis. Además el espesor de la dermis varía considerablemente con la localización anatómica.

El mayor componente de la dermis está representado por la ECM, la cual proporciona un soporte estructura esencial para el crecimiento y elasticidad de la piel (Figura 2). La ECM se forma por proteoglicanos interconectados a una matriz de proteínas como colágeno, elastina y fibronectina producidos por los fibroblastos. A continuación se hace una descripción de los componentes estructurales de la ECM.

1.2.1.2.1 Colágeno

Es la proteína más abundante en el organismo y constituyente de los tejidos conjuntivos como la piel, los tendones y el hueso. Se caracteriza por su notable resistencia (una fibra de 1 mm de diámetro puede soportar una carga de 10 a 40 kg), y es el principal responsable de la fuerza de tensión de la piel. El colágeno está formado por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas (1000 aminoácidos por cadena) agrupadas en una estructura helicoidal, siendo la glicina el constituyente de la tercera parte de cada cadena. La repetición de 333 tripletes de forma Gli-X-Y es la columna vertebral de la estructura de triple hélice helicoidal. En la posición X se encuentra, en la mayoría de los casos, la prolina, y en la posición Y se encuentra la hidroxiprolina y la hidroxilisina³⁶.

El colágeno constituye un 70-80% de peso seco de la dermis. El 75% es colágeno tipo I, que proporciona la fuerza tensora de los tejidos dérmicos y vasos sanguíneos y contribuye en gran medida a la resistencia mecánica de la piel. El 25% restante son colágenos tipo III y VII. El colágeno es producido y secretado por los fibroblastos dérmicos a partir de la síntesis de la molécula precursora pro-colágeno, el cual es secretado al espacio extracelular y enzimáticamente es convertido a colágeno maduro. Durante el proceso de envejecimiento de la piel, la síntesis de pro colágeno, la actividad de enzimas postraduccionales, la solubilidad y el grosor de las fibras de colágeno decrecen generando cicatrices visibles en la piel como la formación de arrugas, pérdida de fuerza y disminución en el grosor de la piel^{37,38}.

1.2.1.2.2 Elastina

Además del colágeno otra macromolécula que cumple funciones específicas y esenciales en la biología y patología de la piel son las fibras elásticas. Estas fibras le otorgan las características de elasticidad y resistencia a la piel. La elastina conforma una red de microfibrillas compuestas además por varias proteínas como fibrilinas, fibulinas y microfibrilinas asociadas a glucoproteínas³⁸. Las fibras de elastina madura se encuentran en lo más profundo de la dermis, donde funcionan como una red de elastina inter-penetradas y la tropoelastina actúa como bloque constructor de la elastina. En humanos solo existe un gen de tropoelastina, en contraste con la gran variedad de proteínas tipo colágeno. La tropoelastina se produce principalmente durante el periodo fetal y los primeros años de vida cuando las células de los tejidos elásticos producen la elastina requerida para que el cuerpo se desarrolle. Sin embargo a una edad temprana disminuye la producción de tropoelastina y eventualmente se produce menos elastina, por tanto la elastina que tiene una persona adulta es debida a la producida en los periodos prenatal y posnatal. Este hecho de persistencia elástica, sucede toda vez que la elastina es la proteína con mayor tiempo de vida media, siendo de alrededor de 74 años³⁹. La red de elastina ocupa aproximadamente el 2-4% del volumen de la dermis³⁷, y durante el proceso de envejecimiento disminuye de manera progresiva incrementando su degradación, debido a lesiones como quemaduras de sol, exposición a la radiación UV o simplemente envejecimiento.

1.2.1.2.3 Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son compuestos de repeticiones específicas de unidades de disacáridos. Aquellos que se encuentran unidos a una proteína núcleo se conocen como proteoglicanos y se encuentran ampliamente distribuidos en toda la piel. Los GAGs presentes en mayor medida en la piel humana corresponden al ácido hialurónico (no unido a una proteína núcleo) y la familia de los proteoglicanos de sulfatos de congrotina, incluyendo el sulfato de dermatan, formando lo que se conoce como sustancia fundamental. Ésta última actúa como lubricante entre el colágeno y las fibras de elastina durante el movimiento, además ayuda a soportar impactos en la dermis y a mantener el agua en la ECM⁴⁰. Los GAGs pueden absorber hasta 1000 veces su volumen en agua. Por lo tanto, la hidratación de la piel está muy relacionada con el contenido y distribución de los GAGs especialmente el ácido hialurónico en la capa dérmica^{30,37}.

1.2.1.3 Hipodermis

La hipodermis situada bajo la dermis, está compuesta de “adipocitos” agrupados en “lóbulos” separados por una pequeña área ocupada por tejido conectivo. Las arteriolas y vénulas infiltran el tejido conectivo y son responsables de la nutrición del tejido hipodérmico. Los adipocitos se caracterizan por la gran cantidad de lípidos que poseen, los cuales se encuentran agrupados en un solo glóbulo en el citoplasma y su gran tamaño desplaza al núcleo a ocupar la posición periférica. El grosor de la hipodermis varía considerablemente dependiendo de la ubicación en el cuerpo, estado nutricional y sexo del individuo, existiendo generalmente, una mayor acumulación de grasa subcutánea en mujeres que en hombres³⁰.

1.2.1.4 Vascularización cutánea

A excepción de la epidermis, la piel posee una gran red vascular necesaria para suplir los requerimientos nutricionales y cumplir con sus funciones en el organismo como lo son la termorregulación, la cicatrización de heridas, la inmunocompetencia y el control de la presión arterial³⁵. Esta red se origina en las arterias y vasos provenientes de los músculos subyacentes, y forman dos plexos horizontales distintos que se comunican a través de los

vasos que atraviesan horizontalmente la dermis. El plexo profundo se encuentra en la unión dermoepidérmica y proporciona arterias nutricionales a las glándulas sudoríparas y folículos pilosos, y el plexo superficial, derivado de las arterias terminales, que se encuentra en la interfaz entre la dermis papilar y reticular, generando un circuito vascular hacia la superficie.

1.2.1.5 Inervación cutánea.

La piel contiene una red compleja de fibras nerviosas sensoriales y autonómicas. Los nervios sensoriales son nervios aferentes que permiten las sensaciones de dolor, presión, temperatura, vibración y escozor. Algunos receptores especializados se encuentran en la piel para detectar varios de estos estímulos, los cuales incluyen a los corpúsculos de Meissner y de Vater-Pacini. Los primeros se encuentran en la dermis papilar y funcionan como receptores mecánicos que miden la sensación del tacto, terminaciones nerviosas libres y corpúsculos táctiles. Los segundos se encuentran en la unión dermoepidérmica y funcionan como receptores de presión y vibración. Las fibras vegetativas o autonómicas inervan los músculos erectores de vello y glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas, siendo respuestas que no se pueden controlar^{35,40}.

1.2.1.6 Sistema inmune de la piel

El mecanismo de resistencia de la piel a infecciones y agentes externos puede dividirse en respuesta inmunitaria innata o adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa y está compuesta por células que reaccionan inespecíficamente contra ciertos agresores, aunque respuestas carece de memoria inmunológica. En la epidermis las células encargadas de ésta respuesta es queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, linfocitos T y NK. En cuanto a los componentes de la inmunidad adaptativa de la piel son una serie de mecanismos antígeno-específicos realizados por varios componentes celulares de la epidermis y la dermis cuyas características claves son la especificidad y la memoria. En la unidad perivascular dérmica y la epidermis son los sitios fundamentales de ocurrencia de la protección inmunológica. La unidad perivascular dérmica se produce quimiocinas, mastocitos, linfocitos T; mientras que en la epidermis las células de Langerhans y

queratinocitos son los principales responsables de las respuestas inmunológicas adaptativas⁴¹.

1.2.2 Funciones de la piel.

La piel es una estructura dinámica y compleja integrada por células, tejidos y macromoléculas que median una gran variedad de funciones: la piel constituye una barrera física de permeabilidad, protección contra agentes infecciosos, termorregulación, sensaciones, protección contra la radiación UV, secreción y absorción^{30,40}.

1.2.2.1 Función Barrera

La piel es el órgano más expuesto del hombre por ello debe proteger los órganos internos del ingreso de sustancias químicas y prevenir la pérdida de sustancias corporales vitales como lo es el agua y los electrolitos. Esta barrera actúa tanto de afuera hacia dentro como viceversa y solo ciertas sustancias de carácter lipídico pueden ingresar, dependiendo de su peso molecular. Las propiedades de barrera selectiva se deben a la epidermis, especialmente a la membrana basal y stratum corneum³⁰.

1.2.2.2 Función de protección

La piel desempeña una función protectora contra agentes biológicos (bacterias, virus y hongos), físicos y químicos. Cuando una sustancia alcalina es puesta sobre la piel una capa hidrolípida y el stratum corneum la neutralizan antes de que logre generar lesiones internas. Así mismo la radiación UV puede ser neutralizada, en cierta medida, por acción de la melanina y el stratum corneum. Finalmente, la piel juega un papel esencial de protección mecánica amortiguando traumatismos sufridos diariamente³⁰.

1.2.2.3 Función inmunológica

La piel es la primera entrada de sustancias externas y bacterias a nuestro organismo. Las células de Langerhans son las encargadas de identificar la amenaza para preparar la defensa

promoviendo y permitiendo el comienzo de la respuesta inmunitaria celular por medio de los linfocitos de la piel. En algunos casos como la dermatitis por contacto, estas defensas generan respuestas dolorosas como la inflamación siendo esta principal respuesta ante la invasión de agentes externos.

1.2.2.4 Función secretora

Mediante las glándulas cutáneas sebáceas y sudoríparas y la epidermis, la piel protege el cuerpo mediante la eliminación de sebo, sudor y lípidos epidermales, que al mezclarse forman una película hidrolipídica llamada emulsión epicutánea. De hecho tanto el sudor como la queratinización son los principales métodos de eliminación de toxinas, medicamentos y agentes externos.

1.2.2.5 Función de termorregulación

La piel realiza ésta función mediante mecanismos de transpiración, sudor y cambios de vascularización cutánea mediados por el sistema nervioso autónomo. Mediante estos mecanismos, la piel es capaz de adaptar la temperatura corporal en función de la temperatura ambiental. Cuando un individuo tiene calor es porque no hay un intercambio de calor óptimo entre el ambiente y el organismo, esto puede acarrear serios problemas a nivel celular desequilibrando reacciones celulares y puede llevar a la muerte. Por lo tanto cuando hay una temperatura más alta en el organismo se activan las glándulas sudoríparas y los vasos sanguíneos se dilatan para aumentar el flujo sanguíneo bajo la piel produciendo pérdida de calor por diferentes vías físicas (irradiación, convección y conducción) y mediante sudoración. En el caso contrario, cuando un individuo está sometido a condiciones de frío, hay una reducción en la sudoración y hay un efecto de vasoconstricción que disminuye el flujo sanguíneo bajo la piel. Por lo tanto, el principal mecanismo para la termorregulación de la piel es el control de flujo sanguíneo bajo ella, y la activación o no de las glándulas sudoríparas.

1.2.2.6 Funciones de sensibilidad

Así como los sentidos de la vista, el oído y el olfato, la sensibilidad de la piel le proporciona a nuestro cuerpo tener una mayor apreciación sobre su entorno. Los nervios de la piel permiten percibir sensaciones como el dolor, comezón, frío o calor, presión, entre otros estímulos. De esta forma, la piel es el portal de entrada al reconocimiento de nuestro entorno.

1.2.2.7 Función de absorción.

La piel tiene la capacidad de absorber o permitir la entrada de sustancias externas (dependiendo de la naturaleza de las mismas), permitiéndoles ingresar al torrente sanguíneo y generar un efecto en el organismo. La absorción depende del lugar de aplicación, toda vez que en donde la epidermis es más gruesa, hay pocas posibilidades de atravesar ésta barrera como lo son las palmas de las manos y las plantas de los pies. Por su parte, en los lugares donde la epidermis es más delgada como los párpados, cuero cabelludo y en las axilas que son ricas en folículos pilosos y glándulas sudoríparas, se puede presentar una absorción mayor. Éste hecho puede ser favorable para el incremento de la biodisponibilidad de principios activos en el organismo, pero también, es perjudicial porque pueden ingresar sustancias tóxicas y letales.

El stratum corneum puede favorecer la absorción de sustancias por la piel. Ésta absorción es favorecida a sustancias de naturaleza lipídica y se divide en tres pasos: 1) Penetración o paso de sustancias a través de la capa hidrolipídica de la epidermis; 2) Permeación, que permite la difusión a través de las células de la epidermis y la dermis; y 3) Reabsorción, paso a los vasos sanguíneos que se encuentran en la dermis para la distribución al organismo³⁰.

1.2.2.8 Síntesis de vitamina D

Otra función importante es la producción de vitamina D, necesaria en el desarrollo normal de los huesos y vital para el desarrollo durante la niñez, la cual es sintetizada mediante la captación de radiación UV.

1.3 EL ENVEJECIMIENTO DE LA PIEL

La piel humana, así como los demás órganos del cuerpo, experimenta cambios debido al envejecimiento. Durante este proceso ocurren diversos cambios estructurales que afectan las capas de la piel, con un daño más agudo observado en el tejido conectivo de la dermis, causado por la acumulación de redes de elastina desorganizadas, degradación de la estructura de proteoglicanos y la pérdida y fragmentación de colágeno intersticial principalmente por acción de las metaloproteinasas de la matriz (MMP's), lo cual conduce finalmente a la aparición de arrugas y demás signos visibles observados en el envejecimiento^{2,42}. Existen dos tipos diferentes de envejecimiento cutáneo, el envejecimiento generado por el paso del tiempo o por disposiciones genéticas conocido como envejecimiento intrínseco el cual es regulado principalmente por andrógenos y hormonas y el envejecimiento extrínseco causado por la exposición a factores ambientales como exposición a la radiación UV y estilos de vida en general⁴². Aunque el proceso de envejecimiento es debido a la acción simultánea de procesos cronológicos y extrínsecos, cerca del 80% de los cambios en la piel durante el envejecimiento son causados por la exposición a la radiación UV, razón por la cual se conoce como el fotoenvejecimiento^{42,43}.

1.3.1 Envejecimiento intrínseco

El proceso de envejecimiento intrínseco está asociado con los procesos naturales y cronológicos que llevan como consecuencia un desgaste y una disminución en la funcionalidad de los órganos. Las consecuencias del envejecimiento intrínseco se encuentran principalmente en áreas de la piel protegidas del sol. Básicamente los mecanismos moleculares responsables del envejecimiento son los mismos tanto para el envejecimiento intrínseco como para el extrínseco, por ejemplo en ambos se observa una acortamiento de los telómeros, mutaciones del DNA mitocondrial, mutaciones genéticas debido a estrés oxidativo y decrecen en gran medida los niveles hormonales⁴². Sin embargo, en el envejecimiento intrínseco, el acortamiento de los telómeros es uno de los mecanismos que prima. Los telómeros son secuencias de DNA que se encuentran en las puntas de los cromosomas de los eucariotas, los cuales cumplen la función de protección de las secuencias

que regulan la expresión genética y por tanto protegen el genoma y la vida media de las células². El acortamiento de los telómeros evita que los fibroblastos se reproduzcan con total normalidad observándose una disminución en la producción de las macromoléculas de la ECM. Además, debido a la producción fisiológica de ROS y la acumulación de estrés oxidativo que enfrentan las células de la dermis durante el envejecimiento, se incrementa la expresión genética de las MMP's generando una combinación de factores que llevan como consecuencia la disminución de la elasticidad, pérdida de firmeza y la formación de arrugas, o en términos generales los signos visibles y conocidos del envejecimiento⁴⁴.

Adicional a los mecanismos moleculares que se encuentran involucrados en el proceso de envejecimiento intrínseco, existen otros factores como los antecedentes étnicos (raza) y las variaciones anatómicas que también afectan al proceso cronológico de envejecimiento. Por ejemplo, se presentan variaciones en la cantidad de melanina sintetizada en la epidermis (ver: Epidermis) que protege la piel de la radiación UV, hay zonas de piel más gruesas que otras y existen individuos con diversas variaciones genéticas que podrían verse menos afectados por la edad².

1.3.2 Envejecimiento extrínseco

El envejecimiento extrínseco es consecuencia de la exposición a factores ambientales como la exposición a la radiación solar, al tabaquismo y otros factores relacionados con el estilo de vida como la dieta, sueño y en general la salud y ocurre en diferentes grados de intensidad. Sin embargo se ha sugerido que alrededor del 80% del envejecimiento cutáneo se atribuye a la exposición a la radiación UV^{2,45}. Éste proceso ha sido ampliamente estudiado y debido a la importancia fisiológica recibe el nombre de fotoenvejecimiento. En el fotoenvejecimiento contribuyen tanto la radiación UVB (290-320 nm), como la UVA (320-400 nm). La UVB representa alrededor del 5% de la radiación total que ingresa a la tierra y actúa principalmente en la epidermis. En esta capa de la piel, la radiación UVB no solo causa daños en el DNA de queratinocitos y melanocitos sino que también es la responsable de la producción de factores solubles incluyendo enzimas proteolíticas, que posteriormente pasan a afectar las ECM de la dermis. De la UVB absorbida por la piel, solo el 10-30% logra atravesar la epidermis y llegar

a la dermis donde afecta principalmente los fibroblastos confluendo en el daño de la ECM y por tanto degradación de la dermis. Aunque la UVA es 10-100 veces más abundante que la UVB (dependiendo de la temporada y la hora del día), se ha encontrado que los fotones de la UVA son biológicamente menos activos que los fotones de la UVB, sin embargo ambos son importantes durante el proceso de fotoenvejecimiento.

El daño en la dermis inducido por la UV es debido al cambio estructural y funcional de tres componentes moleculares básicos: fibras de colágeno, red de elastina y glicosaminoglicanos. Los principales factores del daño en la dermis corresponden a la disminución en la síntesis de estas macromoléculas, así como a la falta de organización en la estructura de la ECM a causa de la acumulación de fragmentos no reparados de colágeno y elastina, y al incremento en la expresión de MMP's encargadas de degradar las macromoléculas de la ECM. Además las células quemadas por el sol experimentan apoptosis, asistido por la caspasa-3, un biomarcador que determina el nivel de daño cutáneo inducido por radiación UV^{2,5,46,47}.

1.3.3 Fotoenvejecimiento

El fotoenvejecimiento es la superposición del daño inducido por la radiación ultravioleta con los cambios generados por el envejecimiento cronológico, conllevando en la mayoría de los casos a cambios relacionados con la apariencia de la piel⁹. Clínicamente, el fotoenvejecimiento se caracteriza por formación de arrugas profundas, laxitud, apariencia coriácea, aumento de la fragilidad, formación de ampollas y problemas de cicatrización⁷, contrario a la piel envejecida intrínsecamente, la cual es delgada y elásticamente reducida, pero suave. A nivel histológico, la piel envejecida por factores intrínsecos muestra atrofia general de la matriz extracelular, con una disminución de la elastina y la desintegración de las fibras elásticas. Mientras que la piel que ha sufrido del proceso de fotoenvejecimiento se caracteriza por una pérdida de colágeno dérmico maduro. Además, el colágeno tipo VII que contiene fibrillas de anclaje que contribuyen a la estabilización de la unión dermoepidérmica se encuentran severamente reducido en piel fotoenvejecida⁷, al igual que un aumento en la deposición de glicosaminoglicanos y material de elastosis distrófica.

1.3.3.1 Morfología de la piel expuesta a radiación UV

La piel que ha sufrido envejecimiento cronológico, es decir aquella que se encuentra menos expuesta a la radiación UV, tiene una apariencia delgada, suave, seca, sin manchas y presenta pérdida de elasticidad. Se presenta además un nivel de atrofia en la matriz extracelular, una disminución en el número de fibroblastos en la dermis y disminución de elastina y colágeno. En comparación, la piel de zonas expuestas a la radiación UV la cual presenta una apariencia arrugada, laxa, coriácea, con manchas y algunos puntos cafés (pecas). Estudios histológicos revelan que en la piel foto envejecida se incrementa el grosor de la epidermis y se presentan alteraciones en la organización del tejido conectivo debido a la acumulación de material de elastina y fibras de colágeno no reparado en la unión dermoepidérmica y en la dermis^{1,37}.

1.3.3.2 Especies reactivas de oxígeno inducidas por UV

Aunque las ROS son continuamente producidas en bajos niveles en procesos fisiológicos, existe evidencia sobre los efectos dañinos de altas concentraciones de ROS en piel generadas *in vivo* e *in vitro* después de la irradiación UVA y UVB⁴⁸. Las ROS juegan un papel central en el inicio y desencadenamiento de los eventos de señalización de las células como respuesta a la exposición UV. En la piel expuesta a la UV se incrementa las especies ROS incluidas el anión superóxido (O_2^-) y oxígeno singlete (1O_2) y disminuye los antioxidantes endógenas¹. Tanto en el envejecimiento cronológico como en el fotoenvejecimiento, el incremento en las ROS altera los genes, la estructura proteínica y por ende su función llevando al deterioro de las diferentes capas de la piel.

El anión superóxido (O_2^-) es producido cuando los cromóforos endógenos de la piel absorben radiación UV como el NADH/NADPH, triptófano, riboflavina o ácido *trans*-urocanico y se produce energía que es absorbida por moléculas de oxígeno, el O_2^- es convertido mediante el óxido dismutasa a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cual, mediante procesos fenton (en presencia de metales de transición como hierro y cobre) experimenta la transición a la especie altamente reactiva radical hidroxilo ($(OH)^1$). Ésta especie tiene la capacidad de activar

proteínas como Raf, PTP's (protein tyrosine phosphates), y MEKK1, además de ser el iniciador de las reacciones en cascada de la peroxidación lipídica en las membranas celulares¹.

1.3.3.3 Señales de transducción inducidas por radiación UV en piel humana

Las ROS inducidas por la radiación UV activan receptores de la superficie celular como los receptores del factor de crecimiento epidermal (EGF), interleuquina (IL)-1, insulina, factor de crecimiento de queratinocitos y factor de necrosis tumoral (TNF)- α ⁹. La activación de estos receptores se encuentra mediada en parte a través de la inhibición inducida por ROS de la enzima proteína tirosina fosfatasa- κ , cuya función es mantener los receptores como el receptor EGF en un estado inactivo (hipofosforilado). La activación de los receptores de la superficie celular conlleva a una señalización intracelular a través del estímulo de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP) p38 y JNK, figura 3. La activación de las quinasas induce a la transcripción del complejo activador AP-1 que se encuentra compuesto por las proteínas c-Jun y c-Fos^{1,7,49}.

El incremento en la transcripción y actividad de AP-1 interfiere con la síntesis de los colágenos tipo I y III, mediante la inhibición del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), una citoquina encargada de aumentar la transcripción genética del colágeno y regula negativamente la proliferación de queratinocitos. Los efectos de señalización de TGF- β son mediados a través de la activación de proteínas de señalización intracelular SMAD2 y SMAD3, las cuales son antagonizadas por el señalizador intracelular SMAD7. La radiación UV induce la proteína SMAD7 en piel humana interfiriendo con el complejo señalizador TGF- β /SMAD2-3^{50,51}. Lo anterior desencadena la proliferación de queratinocitos y la hiperplasia epidermal, lo que conlleva a un decrecimiento en la producción de pro colágeno tipo I y finalmente a la pérdida de colágeno en la dermis. AP-1 también decrece los niveles de los receptores de TGF- β , por tanto se inhibe la transcripción para el colágeno. Por consiguiente en la piel que presenta daño debido a la exposición a la radiación UV, la síntesis de colágeno se encuentra reducida^{9,36}. Se ha demostrado también que AP-1 es inducida por la proteína rica en cistena 61 (CYR61), el cual es un regulador de la síntesis de colágeno

que es inducido por la radiación UV en fibroblastos. CYR61 desencadena la síntesis de enzimas como las MMP-1 que degradan los componentes de la ECM, también decrece la producción de pro colágeno tipo I y regula negativamente los niveles del receptor de TGF- β . Finalmente mediante la inducción de AP-1, CYR61 incrementa los niveles de actividad de las MMP's, específicamente MMP-1, -3 y -9^{52,53}.

Adicionalmente, la radiación UV activa el factor de transcripción nuclear NF- κ B que induce la expresión de citoquinas pro inflamatorias como IL-1, IL-6, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y TNF- β , proteínas envueltas en la inmunoregulación y supervivencia celular, y estimulan la expresión de MMP's⁵⁴. La radiación UV incrementa tanto los niveles de MMP's que los inhibidores de metaloproteinasas de tejidos (TIMP's) encargados de inhibir las MMP's no son suficientes para generar homeostasis en la dermis. Sumado a lo anterior, la degradación de colágeno inducido por radiación UV es generalmente incompleta, conllevando a la acumulación de fragmentos de colágeno degradado en la dermis, y éstos se cree reducen la integridad funcional de la dermis (Figura 3).

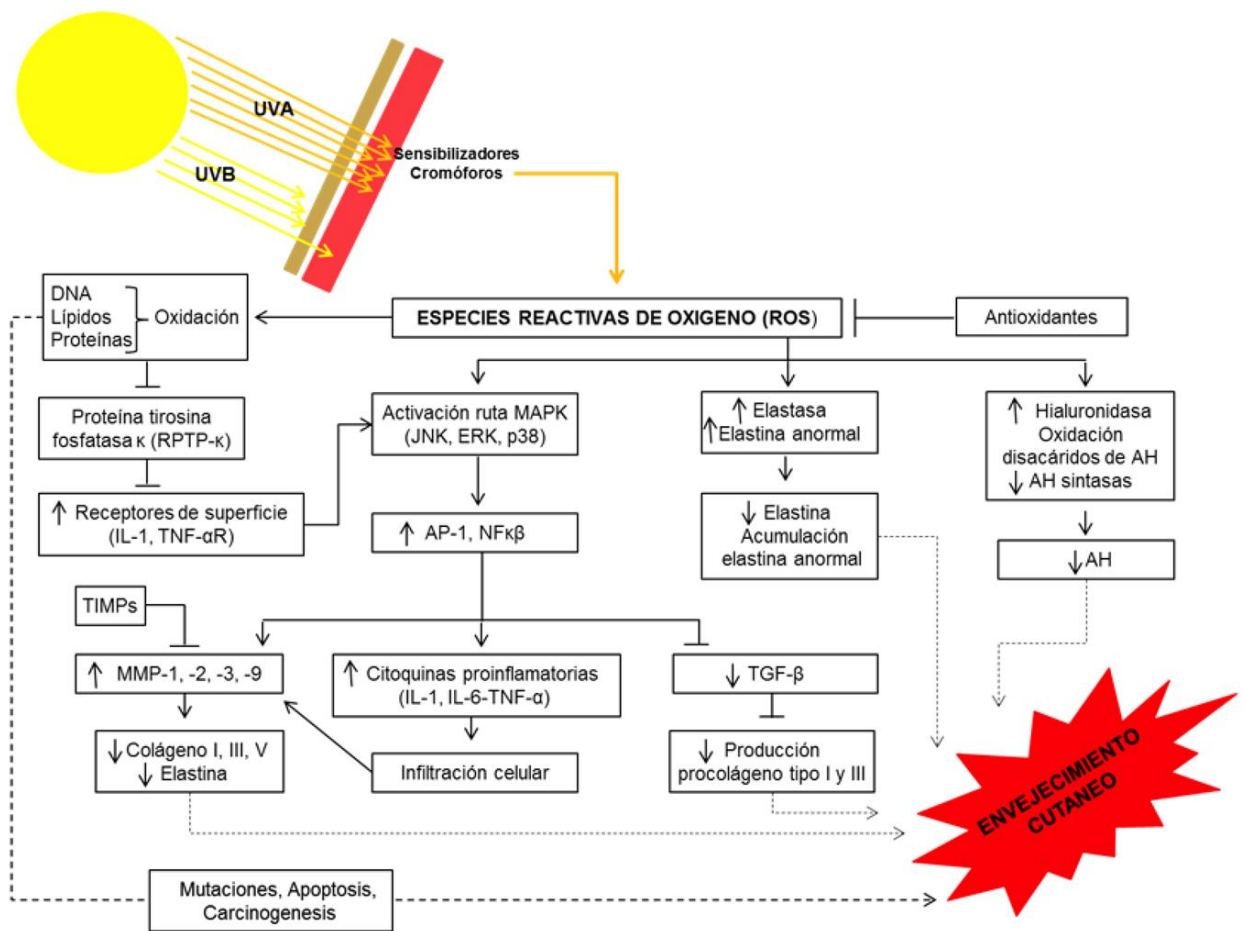


Figura 3: Representación esquemática de la influencia de ROS, producida por la radiación UV, sobre el envejecimiento cutáneo⁵⁵. Las ROS activan los factores de transcripción NFκβ y AP-1 via activación de quinasas, resultando en un incremento en la expresión de MMPs y disminución en la expresión de pro-colágeno I y III. Además las ROS activan las enzimas elastasa e hialuronidasa, que en conjunto contribuyen a la degradación de los componentes de la ECM. Siglas: MMP: Metaloproteinasas; AH: Acido hialurónico; TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas.

1.3.3.4 Expresión de MMP's mediada por AP-1

AP-1 regula una gran cantidad de genes involucrados en el crecimiento y diferenciación celular, entre ellos se encuentra la transcripción de las MMP's. Las MMP's son una gran

familia de endoproteasas dependientes de zinc y actúan sobre diversos sustratos, de esta manera tienen la capacidad de degradar las proteínas de la matriz extracelular, las cuales son producidas en las células como proenzimas². El rompimiento proteolítico de su prodominio resulta en la activación de su actividad catalítica la cual puede ser regulada por inhibidores endógenos conocidos como TIMP's o mediante la transcripción primaria y/o activación de la proenzima.

Varios MMP's son sobre regulados mediante AP-1, entre los que se encuentran MMP-1 (colágeno intersticial o colagenasa 1) el cual inicia la degradación de los colágenos tipo I y III, MMP-9 (gelatinasa B) encargada de degradar los fragmentos de colágeno generados por la colagenasa y MMP-3 el cual degrada el colágeno tipo IV¹. La inducción de los MMP es en cierta medida responsable del daño observado en el tejido conectivo de la piel durante el proceso de fotoenvejecimiento, las tres MMP inducidas mediante la activación de AP-1 luego de la exposición a la radiación UV tienen la capacidad de degradar el colágeno fibrilar de la dermis⁵⁶, generando daños en el tejido conectivo de la piel, no solo por la disminución de colágeno maduro en la dermis sino por la acumulación de fragmentos de colágeno parcialmente degradado lo que contribuye al daño en la estructura funcional de ECM.

Además de la inducción a la sobreexpresión de MMP, AP-1 también inhibe la síntesis de colágeno inhibiendo la expresión de genes de pro-colágeno tipo I y III⁵⁷. De hecho, dos mecanismos contribuyen a la reducción de la expresión de genes de pro-colágeno, una de ellos es mediante la activación de AP-1 inducida por la exposición a UV, el cual regula negativamente la transcripción de los genes que codifican para pro-colágeno tipo I (COL1A1 y COL1A2). Los niveles del mRNA del pro-colágeno tipo 1 disminuyen después de una exposición de 8 h en piel humana *in vivo* y llega a estar ausente después de 24 h de irradiación¹. El segundo mecanismo es mediante la regulación negativa del receptor tipo II TGF- β , la principal citoquina profibrótica, la cual regula múltiples funciones celulares como proliferación, inducción y síntesis de proteínas de la ECM^{1,57-60}. Como consecuencia, la piel foto envejecida se presenta con una pérdida en la cantidad de colágeno total en la dermis, tanto por degradación de colágeno maduro como por inhibición en la síntesis de su precursor

pro colágeno dando como resultado cambios en la matriz estructural de la dermis y por tanto la aparición y formación de arrugas y pérdida en la funcionalidad de la piel.

1.3.3.5 Efectos de la radiación UV en el ácido hialurónico y la elastina

La hialuronidasa es una enzima lisosomal encargada de la regulación del ácido hialurónico. Esta enzima pertenece a la familia de las hidrolasas de glucósidos endolíticos que depolimerizan los enlaces β 1-4 entre los *N*-acetilglucosamina y el ácido glucorínico del hialuronano (ácido hialurónico). El contenido de ácido hialurónico en la piel disminuye con la edad, acción que es debida principalmente a la hialuronidasa, la cual incrementa con la edad y es estimulada por la radiación UV-B generando una disminución en la humectación de la piel, y por tanto se afecta el transporte de iones y otras macromoléculas en el espacio extracelular. Por su parte la elastasa es una enzima capaz de hidrolizar macromoléculas de la ECM como la elastina y la fibrilina, y pertenece a la familia de las quimotripsinas. La activación y secreción de la elastasa en fibroblastos dérmicos en respuesta a la radiación UV y/o liberación de citoquinas por queratinocitos, está relacionado con la degradación de la red tridimensional de fibras elásticas y por tanto, se presenta la pérdida de elasticidad y formación de arrugas en la piel^{33,43}.

1.3.3.6 Daño al DNA y mutación en la piel

El DNA es el principal cromóforo que absorbe la radiación UV-B en la piel. Los dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) y foto dímeros de pirimidina son los productos intermedios más frecuentes que son formados después de la exposición a la radiación UV-B, lo cual resulta en la ruptura del DNA. Evidencias de éstas rupturas se han encontrado tanto en la dermis como en la epidermis². Igualmente, las ROS pueden afectar indirectamente el DNA ya sea por los productos de peroxidación lipídica o por la interacción directa con las bases de DNA. Aunque pueden haber diversos mecanismos que conllevan al daño del DNA, uno de los más estudiados es la conversión de residuos de guanina a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deociguanina (8oxo-dG) mediada por el radical hidroxilo⁴⁶. Si el DNA no se repara correctamente puede resultar en cambios en la secuencia de ácidos nucleicos,

específicamente la mutación de guanina/citosina a adenina/timina cuando se está dando el paso de la replicación de DNA⁴⁶.

1.3.3.7 Daño mitocondrial

El daño mitocondrial también ha sido ampliamente usado para explicar el proceso de envejecimiento^{5,9,43,46}. Aunque la principal función de la mitocondria es la producción de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa, como subproducto de este proceso se obtiene pequeñas cantidades de ROS. Debido a que la mitocondria también contiene mtDNA (a pesar de ser circular y aportar solo un 3% del material genético celular), es altamente susceptible al daño generado por ROS, limitando la capacidad de la mitocondria para producir de manera efectiva los polipéptidos que codifican el mtDNA. Como resultado la cadena de transporte de electrones no funciona eficazmente y disminuye la capacidad de producir ATP pero contribuye en mayor medida a la sobreproducción de ROS. La pérdida de la capacidad de las mitocondrias y la generación concomitante de ROS fisiológica e inducida por radiación UV, genera un mayor daño en la célula y en la matriz extracelular, deteriorando la dermis tanto estructural como funcionalmente.

1.4 FOTO ENVEJECIMIENTO: PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

En muchos aspectos, como ha sido descrito durante el desarrollo de éste capítulo, las ROS representan un papel clave en la determinación de la apariencia y bienestar de la piel. Las ROS se encuentra relacionados con la disminución en la viabilidad celular y degradación de la estructura funcional de la dermis, contribuyendo significativamente al proceso de envejecimiento de la piel. La constante exposición a la radiación UV y otros agentes que pueden desencadenar en la producción desmedida de ROS generando daños excesivos los cuales no logran ser mitigados por las defensas naturales de la piel⁶¹. Productos de origen natural han demostrado poseer actividades antioxidantes que logran atenuar los efectos adversos de las ROS en la piel, actuando como agentes fotoprotectores^{8,16,62}, por tanto no es de extrañar que los consumidores estén cada vez más interesados en productos cosméticos

para el cuidado de la piel, especialmente los productos naturales que cada vez toman más importancia dentro de la industria cosmética, principalmente por efectos colaterales demostrados en productos de origen sintético⁸, y más aún debido a la percepción del consumidor sobre la seguridad y eficacia que presentan los productos naturales.

Los ingredientes naturales usados para mejorar la apariencia de la piel han sido empleados desde tiempos ancestrales. Existen evidencias alrededor del mundo sobre el uso de ingredientes naturales para el cuidado de la piel incluso desde la era paleolítica⁶³. Los cosméticos han sido parte de culturas prosperas y desarrolladas; por ejemplo los egipcios y los árabes han usado productos cosméticos desde hace 4000 años, para el año 2920 A.C ya se habían desarrollado productos cosméticos usando mercurio y alrededor de 1930 A.C los perfumes ya hacían parte de la cultura egipcia. En la actualidad según datos para el año 2014, el mercado global de productos cosméticos de origen natural estuvo alrededor de los \$33 billones, y las ventas globales presentaron un incremento del 10% respecto al año anterior⁶⁴ con mercados crecientes en Asia Pacífica y Brasil. Los productos cosméticos poseen varias categorías, de las cuales aquellos enfocados al cuidado de la piel representan el 23% (2010) del mercado mundial, y dentro de estos la subcategoría de productos antienvjecimiento constituyó el crecimiento más rápido del mercado de los productos para el cuidado de la piel en tres de los cuatro mercados más grandes: USA, Japón y China (2011)¹².

1.4.1.1 Prevención y tratamiento para el foto envejecimiento de la piel

Existen diversas medidas de prevención y tratamiento para desacelerar y atenuar el daño a piel debido al fotoenvejecimiento. La primera consiste en acciones preventivas para evitar el daño ocasionado por la radiación UV como el uso de ropa e implementos que cubran la piel junto con el uso de protectores solares. Una segunda estrategia es el uso de productos cosméticos con ingredientes naturales con propiedades antienvjecimiento que logren atenuar los signos visibles en la piel causados por la exposición a la radiación UV. Finalmente cuando el daño es muy pronunciado, la tercera estrategia involucra el sometimiento a tratamientos invasivos como peeling químico, laser, toxina botulínica y aumento de tejidos blandos⁶⁵.

Enmarcados en la segunda estrategia un producto antienvjecimiento ideal no solo debe tener un efecto protector y reparador, sino que también debería ocuparse de generar un efecto positivo sobre la salud de la piel en general, reestableciendo la síntesis de colágeno y disminuyendo la degradación de éste, además de ayudar a mantener una apariencia juvenil y la funcionalidad de la piel⁶⁶. Así, el espectro de acción de un producto antienvjecimiento debería enfocarse en uno o varios de los mecanismos mostrados en la Figura 4, ya sea mediante la regulación celular interfiriendo en el metabolismo de fibroblastos y vías de señalización, y/o la actividad antioxidante reduciendo así los niveles de ROS, la actividad de MMP's y otras enzimas que degradan los componentes de la ECM.

En este sentido, los productos naturales antienvjecimiento han ganado mucha popularidad entre la industria cosmética y los consumidores. Una gran variedad de plantas y metabolitos secundarios presentan actividades que logran abarcar uno o varias de las funciones determinadas en la Figura 4 por lo tanto, no solo a nivel económico sino a nivel biológico, los productos naturales representan alternativas de valor en el desarrollo de productos antienvjecimiento.

1.4.2 Compuestos bioactivos de origen natural usados contra el envejecimiento de la piel

El uso de compuestos bioactivos de fuentes naturales obedece a sus propiedades benéficas en el tratamiento y/o prevención de ciertas enfermedades, así como en la disminución de los daños en la piel debido a la exposición a la radiación solar. Con ello, los antioxidantes de origen natural proveen un amplio espectro de posibilidades para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas (parcial o totalmente) por el estrés oxidativo, como son algunas enfermedades inflamatorias y aquellas causadas por la exposición a la radiación UV⁶⁷. Compuestos de origen natural han demostrado atenuar los daños causados por los efectos de la radiación UV mediante diversos mecanismos, como la actividad captadora de radicales libres dañinos para la piel mediante su quelación y estabilización o ya sea modulando las cascadas señalización inducidas por la radiación UV, entre otros^{2,8,68}.

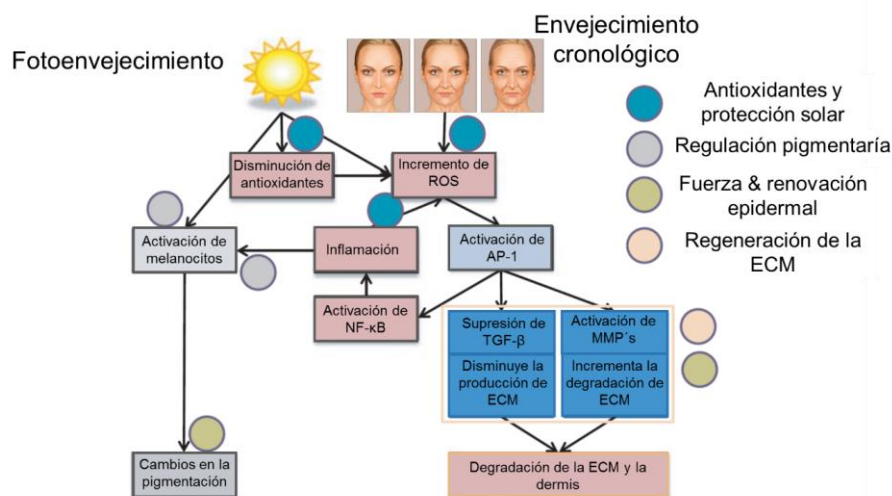


Figura 4. Rutas bioquímicas asociadas con el envejecimiento intrínseco y extrínseco⁶⁶(modificado). Tanto el envejecimiento intrínseco como extrínseco comparten algunas rutas bioquímicas. Un producto tópico anti envejecimiento ideal debería cumplir las siguientes funciones: 1) Antioxidante y protector solar: Prevenir el daño inducido por radiación UV, incrementar la capacidad antioxidante en la piel, regenerar antioxidantes naturales. 2) regulación pigmentaria: inhibir la producción de melanina, prevenir la activación de melanocitos. 3) Fuerza y renovación epidermal: incrementar la barrera de la piel y aumentar la renovación celular de la piel. 4) regeneración de la ECM: prevenir la degradación de ECM, inducir la síntesis de los componentes de la ECM, mejorar la comunicación celular.

Entre los agentes antioxidantes y fotoprotectores más importantes se encuentran los compuestos fenólicos. Estos compuestos son altamente consumidos en la dieta humana, muchos de ellos son los responsables del color y el sabor en frutas y verduras y son usados en el desarrollo de formulaciones cosméticas de uso tópico^{10,69}. El término fenólico engloba cerca de 8000 compuestos de origen natural⁷⁰, los cuales poseen en su estructura básica al menos un anillo aromático con al menos un sustituyente hidroxilo. De hecho, la estructura química de los compuestos fenólicos es la responsable de sus propiedades reductoras, las cuales proporcionan la actividad antioxidante y captadora de radicales libres.

Entre los compuestos fenólicos más usados por su actividad antioxidante y fotoprotector se encuentran los ácidos fenólicos y los flavonoides^{16,71}. Los ácidos fenólicos pueden ser divididos en dos clases: 1) los derivados de ácido benzoico como ácido gálico y derivados

de ácido cinámico como los ácidos cumárico, ferúlico, cafeíco, y 2) los ácidos esterificados como el ácido quínico y ácido clorogénico. Los flavonoides son los polifenoles mas abundantes en la dieta. Su estructura básica contiene un esqueleto de 15 carbonos dispuestos, C6-C3-C6 definidos como anillos A, B y C respectivamente, dispuestos generalmente en 2 anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 carbonos como se ilustra en la Figura 5. De acuerdo al estado de oxidación del anillo central C, se dividen en 6 grupos, y en cada subgrupo existen variaciones debido a los diferentes patrones de hidroxilación, metoxilación, prenilación y glicosilación. Las subclases de flavonoides son: 1) flavonoles, encontrados en cebollas, manzanas vino rojo, té, brócoli y *Gingo biloba*; 2) flavonas, siendo la manzanilla una importante fuente; 3) isoflavonas, las cuales predominan en la soya; 4) flavanonas, encontradas principalmente en frutas cítricas; 5) antocianidinas, altamente distribuidas en berries y cherries y 6) flavanoles representadas como catequinas encontradas en vino rojo, té y manzanas⁵⁵. Las estructuras básicas se encuentran en la Figura 5.

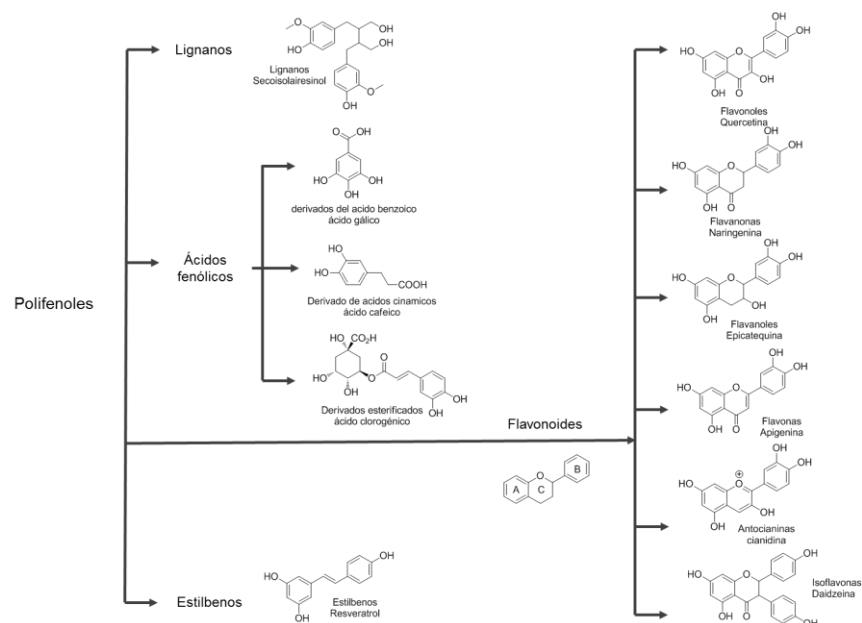
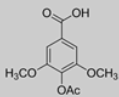
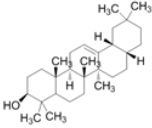
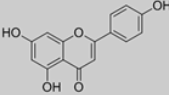
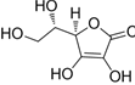
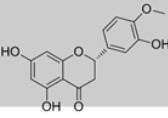
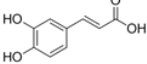
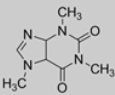
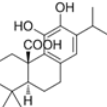
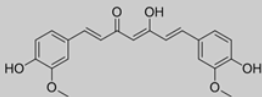


Figura 5. Clasificación y estructura de polifenoles.

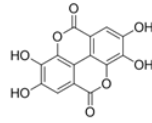
Para una gran cantidad de metabolitos de carácter fenólico, algunos de ellos polifenoles, se han reportado efectos foto protectores y antienvjecimiento mediante diversos mecanismos, algunos de estos metabolitos que representan importancia biológica por su capacidad para

atenar o desacelerar los procesos de fotoenvejecimiento se encuentran en la Tabla 1 al igual que su actividad y mecanismo

Tabla 1. Plantas y metabolitos secundarios asociados con propiedades antienvjecimiento 2,19,67,70,71

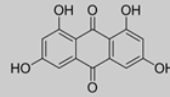
Compuesto Planta	Estructura	Mecanismo
Ácido siringico Tagetes erecta (hojas)		Inhibición de elastasa, hialuronidasa, y MMP-1, inhibición de ROS.
B-Amyrin Tagetes erecta (hojas)		Inhibición de elastasa, hialuronidasa, y MMP-1, inhibición de ROS.
Apigenina Matricaria recut (flores)		Inhibición de radiación UV, reducción en la incidencia de cáncer e incremento de células no tumorales, inhibición de la actividad de MMP-1, disminuye la expresión de MMP-1 y AP-1.
Ácido ascórbico Citrus sinensis (fruta)		Rompimiento de procaspasa-3 traslocación de NFκB y AP-1 Inhibición de hialuronidasa y elastasa actividad captadora de radicales libres
Hesperetina Citrus sinensis (fruta)		Actividad antitirosinasa y antioxidante, Protección contra necrosis celular en fibroblastos dérmicos humanos inducido por UV-A (FEK4)
Ácido cafeico Hibiscus rosa sinensis (hojas y flores)		Protector contra los daños de la radiación UV en piel, captador de radicales libres actividad inhibitoria contra MMP-9
Cafeína Camelia sinensis (hojas)		Inhibidor de mutaciones en p53 inducidas por UV-B, inhibidor de carcinogénesis inducias por UV-B
Ácido carnósico Rosmarinus officinalis (parte aerea)		Capacidad captadora de radicales libres y modulación de metabolismo de enzimas xenobioticas, fotoprotector mediante inhibición de MMP-1 mediante la expresión en mRNA en fibroblastos humanos.
Curcumina Curcuma longa (Rizoma)		Inhibición de la expresión de MMP-1 y MMP-2, inducción de apoptosis, activación de caspasa-3, -8 y -9, liberación de citocromo c, inhibición de COX-2 y expresiones de c-Jun N-terminal quinasa y p38 en queratinocitos humanos irradiación con UVB

Ácido elágico
Terminalia Chebula (fruto)



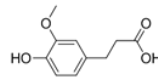
Atenuación de la toxicidad de UV-B en queratinocitos y fibroblastos dérmicos humanos, inhibición de la producción de MMP en fibroblastos expuestos a UV-B, inhibición de apoptosis inducida por UV-A en queratinocitos, disminución de la fragmentación de DNA y disfunción mitocondrial, activación de caspasa-3, inhibición de tirosinasa.

Emodin
Aloe vera (hojas)



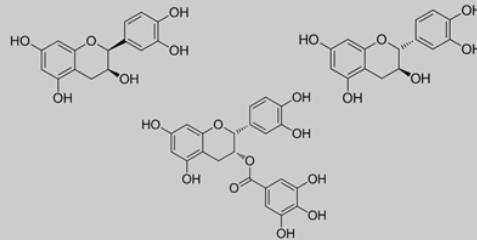
Inhibición de MMPs, inhibición de tirosinasa, aumento de los niveles de RNA y expresión de superóxido dismutasa.

Ácido ferúlico
Theobroma cacao (fruto, semillas)



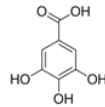
Antioxidante para prevenir el daño por la radiación UV y carcinogénesis de piel.

Epicatequina, catequina, epigallocatequina galato. Camelia sinensis (fruto)



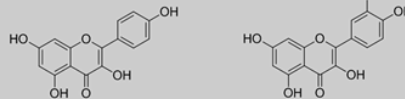
Supresión de eritema cutáneo causado por radiación UV, disminución del grosor epidermal causado por UV, supresión de la sobreexpresión de MMP-2, MMP-9 modulación de NFκB y MAPK, disminución de H₂O₂ restauración de bajos niveles de GSH por efecto de UV-B, inhibición de tumores cutáneos, incremento de apoptosis.

Ácido Gálico
T. Chebula, embilica officinalis (fruto)



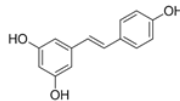
Inhibidor de tirosinasa, MMP-2, elastasa hialuronidasa, collagenasa, inductor de los niveles de TIMP-1

Quercetina, kaempferol
Calendula officinalis (hojas y flores)



Control en la producción de MMP-2 y MMP-9, mejora la síntesis de colágeno y el tejido conectivo subepidérmico, inhibidor de el daño oxidativo en la piel producido por la radiación UV-B, inhibidor de la expresión de MMP-1, captador de radicales libres protector contra la peroxidación lipídica reduciendo la cantidad de MDA, actúa como agente quelante.

Resveratrol
Vitis vinifera (fruto)



Inhibidor de edemas cutáneos causador por UV-B, disminuye la producción de H₂O₂ inducidos por UV.B, inhibe la activación de NFκB y la ruta MAPK, inhibe la expresión de MMP-2 y MMP-9, inhibición de melanoma múltiple en líneas celulares.

1.5 CADENA DE PLANTAS AROMATICAS, MEDICINALES, CONDIMENTARIAS Y AFINES -PAMCYA-

En Colombia el sector productivo de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y afines –PAMCyA- es naciente, encontrándose varios vacíos de información. Existe una carencia de datos consolidados sobre las especies comercializadas a nivel nacional o internacional (especialmente para especies medicinales o aromáticas nativas), volúmenes transados, o la distribución y el estado de conservación. Este vacío se da en primera instancia por la amplia variedad de plantas que reúne éste subsector productivo pues en Colombia se presentan especies nativas, naturalizadas e introducidas y en segunda instancia por ser un sector que a pesar de su impacto económico, está conformado principalmente por medianos y pequeños productores⁷².

El tamaño del mercado de los productos de la cadena de PAMCyA es muy difícil de cuantificar dado el gran número de productos que componen este mercado, sin embargo según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, entre los años 2009 a 2012 se presentó un incremento en la producción de cerca del 52%, (5803 toneladas para 2009, 12315.7 toneladas para el año 2012)⁷³. A pesar de las debilidades que presenta la cadena, el subsector de plantas aromáticas y medicinales se ha posicionado como una alternativa de producción y exportación de alta dinámica de crecimiento, convirtiéndose en el segundo renglón generador de divisas dentro de las exportaciones agrícolas no tradicionales. Este mercado se duplicó entre 2009 y 2013, pasando de 15.9 a 31.9 millones de dólares anuales en productos como las hierbas aromáticas, especias y té.

A pesar de la gran apuesta comercial que representan las plantas aromáticas y medicinales, se presentan debilidades en cuanto al aprovechamiento real de estas especies. De la totalidad de las exportaciones, cerca del 6% representan exportaciones de ingredientes naturales, lo cual disminuye drásticamente la potencialidad económica de éstas especies teniendo en cuenta que a mayor transformación de la materia prima, mayor el valor agregado obtenido y mejor incursión en cuanto a competitividad e innovación en el mercado tanto nacional como

internacional. El sector cosmético se presenta como una oportunidad económica de gran importancia para la incursión de las especies PAMCyA en el mercado de ingredientes naturales, debido al gran crecimiento que se ha generado en éste sector no solo a nivel internacional sino nacional. Si se considera además que ésta cadena cuenta con la priorización de la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural a nivel nacional y regional (Antioquia) y las medidas arancelarias del gobierno nacional en cuanto a priorización de mercados, en donde se tiene como desafío para el 2032 “ser reconocidos como líder mundial en la producción y exportación de cosméticos y productos de aseo de alta calidad y con base en ingredientes naturales”⁷⁴, el potencial que se puede obtener es bastante amplio. Además no se debe olvidar el beneficio económico que obtendrían no solo las industrias cosméticas, también los productores de PAMCyA.

En síntesis, las plantas aromáticas y medicinales son reconocidas por sus propiedades terapéuticas, además de su amplio uso culinario. Poseen además una gran variedad de metabolitos secundarios²⁰⁻²⁵, de los cuales existen diversos reportes sobre sus propiedades antioxidantes, fotoprotectoras y antienvjecimiento^{2,19,26-28}. A pesar del vasto conocimiento sobre especies aromáticas y medicinales, incluso el uso de estas para el desarrollo de productos cosméticos, es necesario realizar análisis de tamizajes y evaluaciones biológicas que validen su actividad, con el fin de generar ingredientes funcionales, innovadores y ante nada, viables para la industria cosmética en términos de adquisición de materia prima de calidad.

2 CAPITULO II

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIENVEJECIMIENTO DE ESPECIES AROMATICAS Y MEDICINALES

La industria cosmética, y dentro de ella principalmente los cosméticos naturales con acción sobre los procesos de envejecimiento prematuro, es un mercado de importante crecimiento en los últimos años. Además, se establece un crecimiento continuo debido al aumento de dolencias relacionadas con la radiación UV, las enfermedades cutáneas y al incremento en el número de personas que se preocupan por conservar y perpetuar sus atributos de belleza⁶⁵. Con ello se demandan nuevos compuestos o ingredientes seguros y eficaces que puedan ser utilizados, bien sea para prevención y/o tratamiento de los daños causados por la exposición a la radiación UV.

Por otro lado, Colombia presenta varias ventajas competitivas para el desarrollo del sector cosmético, sin embargo, estas ventajas no han sido explotadas y el potencial de cultivos tanto nativos como introducidos esta desaprovechado. En nuestro país se presenta un gran número de especies introducidas que son cultivadas en grandes extensiones de tierra, pero muchas de ellas son comercializadas únicamente como material vegetal fresco y seco, a pesar de poseer metabolitos secundarios de importancia biológica. No obstante, muchas de estas especies son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, presentan reportes bibliográficos abundantes y hacen parte de la cadena de plantas aromáticas, medicinales, condimentarías y afines (PAMCyA). Estas especies se convierten en un blanco atractivo para investigación de potenciales usos debido a la gran cantidad de reportes sobre las diversas actividades que presentan⁷⁵⁻⁷⁷ además de los intereses gubernamentales que giran en torno a ellas^{78,79}.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se han seleccionado algunas especies de la cadena para ser investigadas por funcionalidades cosméticas específicas. En este capítulo, se presentan los resultados de la evaluación biológica obtenida de siete especies pertenecientes a la cadena PAMCyA (representadas en 56 extractos) con base en sus propiedades antienvjecimiento, basados en la protección de los principales componentes de la ECM mediante un estudio sistemático e integrado por diversos blancos mecanísticos. Estos blancos

involucran la determinación de las propiedades antioxidantes y la inhibición de enzimas involucradas con el deterioro de la dermis, específicamente la colagenasa, elastasa e hialuronidasa.

2.1 MATERIALES Y METODOS

2.1.1 Obtención de material vegetal

El material vegetal fue obtenido a partir de diversos productores y exportadores del Oriente Antioqueño durante el año 2014. Se colectaron 7 especies en estadíos de crecimiento comerciales. Una vez obtenidas, las especies se lavaron y desinfectaron a través de sumersión en hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de hipoclorito de sodio con abundante agua. Las partes aéreas de *R. officinalis*, *T. vulgaris*, *A. draculculus*, así como las flores de *C. officinalis*, *M. chamomilla*, y las hojas de *S. sonchifolius* fueron secados a 35°C por 72 h. Con el material vegetal seco se procedió con la molienda en una licuadora eléctrica con el fin de obtener un material particulado fino y homogéneo. Los frutos de *V. meridionale* y los tubérculos de *S. sonchifolius* fueron liofilizados hasta la obtención de un polvo. El material seco y en polvo se almacenó a -20°C.

2.1.2 Preparación de extractos vegetales

Para la obtención de los extracto fueron seleccionados 7 sistemas de extracción con un amplio rango de constantes dieléctricas: Hexano (1.89), acetato de etilo (6.02), acetona (20.7), acetona-agua 75-25% (35.55), acetona-agua 50-50% (50.4), acetona-agua 25-75% (65.25) y agua (80.1). 1 g de material vegetal seco y en polvo se extrajo con 7 mL de cada uno de los sistemas mencionados. El proceso de extracción se realizó por triplicado para cada especie y cada solvente de extracción. La extracción se realizó en ultrasonido durante 45 minutos a 30±5°C a una frecuencia de 37 Hz. Los sobrenadantes fueron filtrados con papel filtro, combinados y centrifugados a 5000 rpm por 30 min. El filtrado resultante se evaporó a presión reducida a 45°C. Se prepararon soluciones stock de 30 y 100 mg/mL de los extractos en DMSO, las cuales fueron almacenados a -20°C.

2.1.3 Determinación de la actividad antioxidante

Para la determinación de las propiedades antioxidantes, se evaluó el contenido de polifenoles totales como una metodología de screening inicial. Las propiedades antioxidantes se determinaron mediante los métodos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) dado que se encuentran relacionados con dos mecanismos diferentes de captación de radicales, los mecanismos HAT (Hydrogen Atom Transfer) y SET (Single Electron Transfer) respectivamente⁸⁰.

2.1.3.1 Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT)

El contenido de polifenoles totales de cada uno de los extractos fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu, según condiciones descritas previamente con algunas modificaciones⁸¹. Brevemente, 25 μL del extracto diluidos en agua destilada se introdujeron en los pozos de un microplato de 96 pozos, junto con 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu en agua destilada, en una proporción 1:10. El plato se agitó e incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 5 min, seguido se adicionó 100 μL de Na_2CO_3 (7.5% p/v) a cada pozo. Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad, se realizó lectura de la absorbancia a 765 nm usando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (Biotek instruments, Inc.; Wonooski, USA). El contenido de polifenoles totales se calculó mediante la interpolación en una curva de calibración realizada con ácido gálico. Los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g extracto).

2.1.3.2 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

La determinación de la captación de radicales de oxígeno en medio hidrofílico se realizó siguiendo condiciones previamente descritas⁸¹ con algunas modificaciones. El reactivo AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro) se usó como generador de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), el trolox como estándar para la curva de calibración y la fluoresceína como sonda fluorescente. Para éste ensayo todos los reactivos fueron preparados en buffer fosfato 92.4 mM a pH 7.4. Inicialmente, 50 μL de muestra (extracto o estándar diluidos en buffer fosfato) fueron mezclados con 150 μL de fluoresceína (1.6 μM) e incubado a 37°C por 30 min. Posteriormente a cada pozo se adiciono 50 μL de una solución de AAPH

(125 mM). La intensidad de la fluorescencia se monitorea cada 2 minutos durante 120 min a una longitud de onda a $485_{\text{ex}}/520_{\text{em}}$ usando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (Biotek instruments, Inc.; Wonooski, USA). La cuantificación del valor ORAC se realizó interpolando el valor del área neta bajo la curva de la muestra (ABC) en una curva de calibración de trolox. Los resultados se expresan como μmol equivalentes de trolox por gramo de extracto ($\mu\text{mol ET/g}$ extracto).

2.1.3.3 Poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP)

La capacidad captadora de radicales libres mediante el método FRAP se realizó siguiendo condiciones previamente descritas con algunas modificaciones⁸². La solución de trabajo FRAP se prepara con buffer acetato (300 mM, pH 3.6), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM en una solución de HCl 40 mM y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM en una proporción 10:1:1, para éste ensayo se usa trolox como estándar. Inicialmente se adicionan en cada uno de los 96 pozos de un microplato, 10 μL de la muestra o trolox diluidos en agua y se mezclan con 250 μL de la solución de trabajo FRAP para ser incubado a 37°C en la oscuridad. La absorbancia es medida a 593 nm usando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (Biotek instruments, Inc.; Wonooski, USA). El valor FRAP se determina por la interpolación de la absorbancia en la curva de calibración realizada con trolox y los resultados son expresados como μmol equivalente de trolox por gramo de extracto ($\mu\text{mol ET/g}$ extracto).

2.1.4 Determinación de las propiedades anti-envejecimiento.

Las propiedades anti-envejecimiento *in vitro* de los 56 extractos se determinaron por su capacidad para inhibir enzimas relacionadas con el envejecimiento cutáneo: colagenasa, elastasa y hialuronidasa. La inhibición enzimática de los extractos se evaluó a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ para colagenasa e hialuronidasa y de 250 $\mu\text{g/mL}$ para elastasa. Estas soluciones se prepararon a partir de una solución stock inicial de 30 mg/mL de extracto en DMSO. Para cada una de las evaluaciones se realizó blanco de DMSO.

2.1.4.1 Actividad anti-colagenasa

La inhibición sobre la enzima colagenasa se midió empleando el kit de ensayo Enzcheck® gelatinase/ collagenase Assay kit, de la compañía molecular probes Inc. La medición de la inhibición sobre la enzima se realizó usando las condiciones sugeridas por el proveedor y aquellas previamente reportadas⁸³. Se emplea el sustrato colágeno tipo I de piel bovina conjugado con fluoresceína, el cual forma un péptido no fluorescente. Este sustrato es digerido por colagenasa tipo IV de *Clostridium histolyticum* produciendo péptidos fluorescentes. El incremento en la fluorescencia es proporcional a la actividad proteolítica de la enzima y se puede monitorear en un lector de fluorescencia. Para el ensayo, 20 µL de una solución del extracto se preparó en buffer Tris-HCl 0.05 M pH 7.6, y se adicionaron a cada pozo de un microplato de 96 pozos junto con 80 µL del sustrato DQ-colágeno tipo I. Posteriormente 100 µL de la enzima activa (colagenasa tipo IV) se adiciono y la intensidad en la fluorescencia fue medida cada min durante 45 min usando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (Biotek instruments, Inc.; Wonooski, USA), a las longitudes de onda 485_{ex}/520_{em}. Para determinar la capacidad de los extractos para inhibir la enzima, se obtuvo la pendiente de la recta obtenida durante los primeros 20 min de la cinética y se comparó con la pendiente obtenida para el control. Como inhibidor de referencia se usó ácido Oleanólico a 250 µM. Para cada extracto se realizó un triplicado del ensayo. El porcentaje de inhibición se calculó usando la ecuación 1.

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{M_{\text{control}} - M_{\text{muestra}}}{M_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde M_{control} y M_{muestra} son las pendientes del segmento lineal obtenido de la cinética fluorescencia vs tiempo del control y muestra, respectivamente.

2.1.4.2 Actividad anti-elastasa

La inhibición sobre la enzima elastasa se midió empleando el kit de ensayo EnzCheck® Elastase Assay kit, de la compañía molecular Probes Inc. En este kit se usa el sustrato elastina de ligamentos de cuello bovino conjugada con fluoresceína para formar un péptido no fluorescente, cuya hidrolisis por acción de la enzima elastasa de páncreas de porcino libera

fluoresceína la cual puede ser monitoreada fluorométricamente. Para el ensayo, se siguieron las recomendaciones del proveedor y las condiciones descritas previamente⁸³. En síntesis, 50 μL del extracto preparado en buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.0 proporcionado por el Kit, se adicionaron a cada pozo de un microplato de 96 pozos, junto con 50 μL del sustrato DQ-elastina e incubados durante 10 minutos. Seguido a la incubación, se adicionan 100 μL de la enzima activa y la intensidad de la fluorescencia fue medida cada min durante 45 min usando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (Biotek instruments, Inc.; Wonooski, USA), a las longitudes de onda $485_{\text{ex}}/520_{\text{em}}$. Para determinar la capacidad de los extractos para inhibir la enzima, se obtuvo la pendiente de la recta obtenida durante los primeros 20 min de la cinética y se comparó con la pendiente obtenida por el control. El ácido Oleanólico a 500 μM fue usado como inhibidor de referencia. Para cada extracto se realizó un triplicado independiente de la reacción. El porcentaje de inhibición de los extractos sobre la enzima elastasa se calculó usando la ecuación 1.

2.1.4.3 Actividad anti-hialuronidasa

La actividad anti-hialuronidasa de los extractos se realizó siguiendo la metodología previamente reportada por Bravo et. al⁸³. La inhibición de hialuronidasa se determinó por la medición de la cantidad de *N*-acetil glucosamina. Brevemente, 30 μL de muestra diluida en buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0, con cloruro de sodio 77 mM y albumina de suero bovino-BSA (0.01%), o sin muestra para el control, se pre-incubaron a 37°C con 90 μL de una solución de hialuronidasa de testículo bovino preparado en la solución antes descrita. La reacción se inicia con la adición de 120 μL de ácido hialurónico preparado en buffer fosfato 20 mM, pH 5.35. Esta mezcla se incubó en baño maría durante 45 min a 37°C. 100 μL de ésta reacción se mezcla con una solución de BSA al 0.1% preparado en buffer fosfato 24 mM con ácido acético 79 mM, pH 3.75, el cual precipita el ácido hialurónico que no había sido digerido por la enzima en forma de *N*-acetil glucosamina. Luego de 10 min de reacción, la absorbancia se mide a 600 nm usando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (Biotek instruments, Inc.; Wonooski, USA). El inhibidor de referencia fue epigallocatequina galato –EGCG a 250 μM . La mezcla control se considera como 100% de actividad y una mezcla denominada sustrato control (90 μL de buffer enzimático sin enzima) se considera

como inactiva. El porcentaje de inhibición de los extractos sobre la enzima hialuronidasa se calcula mediante las ecuaciones 2 y 3.

$$\text{Inhibición (\%)} = 1 - \frac{EA_{\text{muestra}}}{EA_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde EA_{muestra} y EA_{control} fueron las actividades de la muestra y el control respectivamente. El parámetro enzimático EA se calcula como se muestra en la ecuación 3.

$$EA (\%) = 100\% - \left[\frac{A_{600\text{nm}} \text{ muestra}}{A_{600\text{nm}} \text{ Sustrato}} \times 100 \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde $A_{600\text{nm}} \text{ muestra}$ es la absorbancia a 600 nm de la reacción con la muestra, y $A_{600 \text{ nm}} \text{ sustrato}$ es la absorbancia a 600 nm de la reacción del sustrato control.

2.1.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de estos experimentos fue realizado en el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Los resultados muestran el valor promedio de 3 mediciones y su desviación estándar. Se realizaron análisis de correlaciones PCA usando el software para análisis estadístico R, versión 3.1.12 con ayuda del paquete “muma”, y la determinación de los coeficientes de correlación de Pearson para identificar las posibles relaciones entre las variables fue realizada en el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II.

2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Esta investigación fue desarrollada en el marco del programa de fortalecimiento de la cadena de plantas aromáticas, condimentarias y afines –PAMCyA- liderado por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo de Rural de Antioquia. El enfoque principal es la generación de productos nuevos que puedan incursionar en el mercado nacional e internacional^{72,84}, primando el desarrollo de ingredientes naturales para la industria cosmética. En la región de Antioquia, los diversos actores de la cadena habían priorizado 19 especies basados en el volumen de producción y en las demandas nacionales e internacionales: *Ocimum basilicum*

(albahaca), *Allium schoenoprasum* (cebollín), *Artemisia dracunculus* (estragón francés), *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (oregano), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Salvia officinalis* (salvia), *Curcuma longa* (cúrcuma), *Piper nigrum* (pimienta), *Zingiber officinale* (jengibre), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Vaccinium meridionale* (mortiño), *Calendula officinalis* (caléndula), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Taraxacum officinale* (diente de león), *Pimpinella anisum* (anís), *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y *Urtica dioica* (ortiga). Para la ejecución de éste proyecto, se seleccionaron siete de estas especies toda vez que podrían presentar potencial utilización cosmética, basados en reportes fitoquímicos que sugieren la acción de ciertos metabolitos, especialmente de tipo polifenólico, en la modulación de algunos blancos mecanísticos durante el proceso de fotoenvejecimiento^{2,8,68} y en la evidencia farmacológica registrada, en donde las actividades antiinflamatorias, antioxidantes y coadyuvante en inflamaciones cutáneas fueron claves para la selección. Con lo anterior, en la tabla 2, se presentan las especies seleccionadas junto con los metabolitos destacados y las propiedades farmacológicas reportadas para cada una de ellas.

La colecta de las especies se realizó en el Oriente Antioqueño puesto que este es reconocido como la principal zona de producción de plantas medicinales y aromáticas del Departamento de Antioquia, además posee las condiciones edafoclimáticas idóneas para el cultivo y producción de las especies seleccionadas en éste estudio. La selección de los productores fue basada en la capacidad de producción y con ello, asegurar que en las colectas que se realizaran se tuvieran las mismas condiciones de semilla, siembra y suelo. Las especies romero, tomillo y estragón fueron suministradas por la exportadora McHerbs & Mc Oils ubicada en el municipio de la Ceja; la manzanilla fue obtenida de Aromas del Campo – actualmente Biofisis- con sede en El Santuario; y la asociación de productores Asopropam situados en Guarne, proporcionó la caléndula. Por su parte, el cultivo de las especies de mortiño y yacón aún no se encuentra consolidado para su exportación, y no se presentan cultivos extensos como en el caso de las demás especies seleccionadas. Por lo tanto, el material vegetal fue suministrado por los productores independientes del corregimiento de Santa Elena: Ruben Zapata y Luis Eduardo Zapata, respectivamente. En la Figura 6, se

encuentra el registro fotográfico de las especies colectadas junto con los predios o productores que la suministraron.

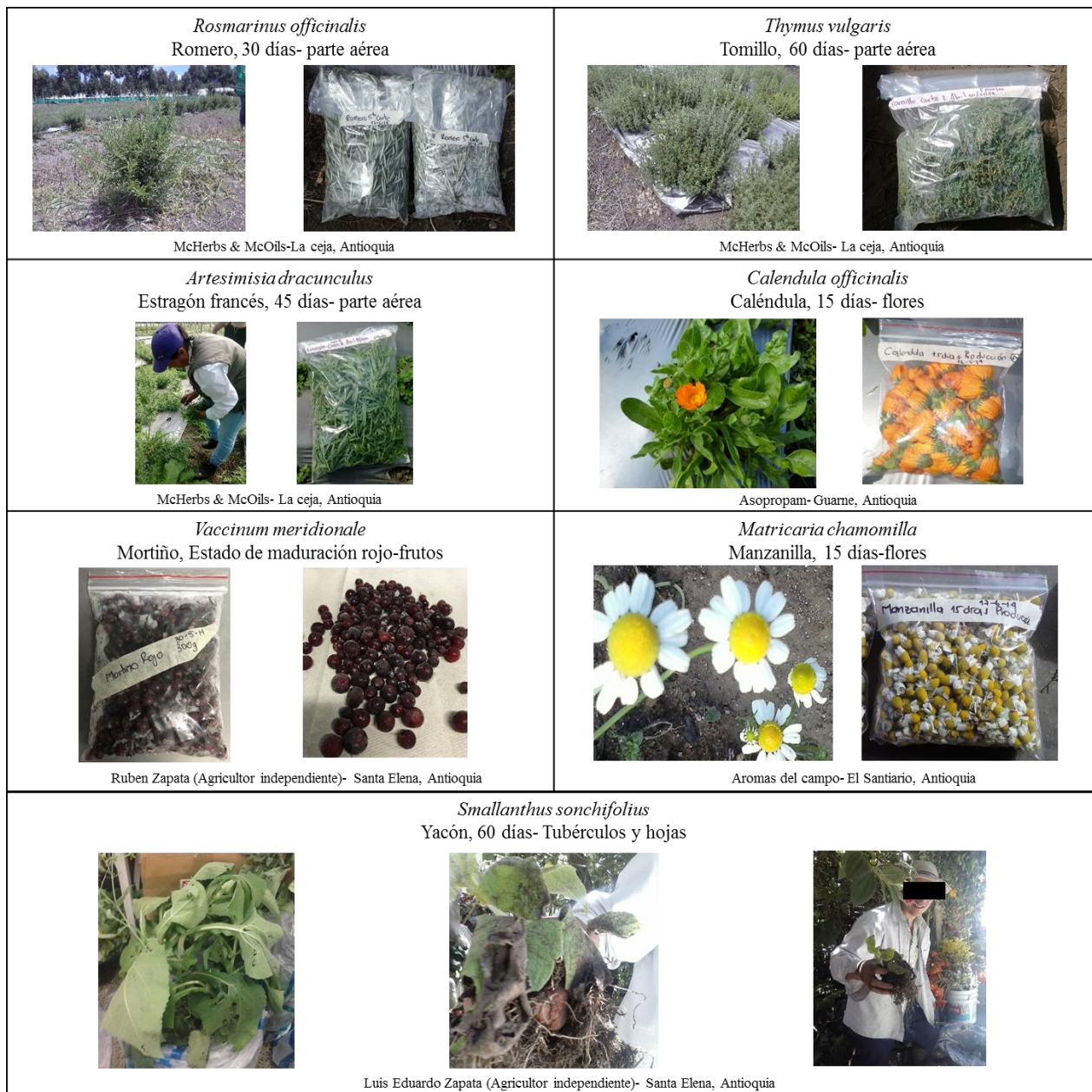


Figura 6. Registro fotográfico de especies colectadas, momento de corte y productores involucrados con el suministro del material vegetal.

Tabla 2. Metabolitos secundarios y algunas propiedades farmacológicas reportadas para las especies seleccionadas.

Especie	Metabolitos secundarios	Propiedades farmacológicas	Referencias
<i>Rosmarinus officinalis</i> Lamiaceae	Borneol, ácido rosmarinico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido Carnosico, Rosmanol, Carnosol, Diterpenos,	Antitumoral, fotoprotector, antioxidante, antimicrobiano	Castro Restrepo et al., 2013; al-Sereiti, Abu-Amer, & Sen, 1999, Martin et al. 2008, Celiktas, Kocabas, Bedir, & Sukan, 2007 ^{28,85-87}
<i>Thymus Vulgaris</i> Lamiaceae	Timol, ácido cafeico, ácido rosmarínico, derivados cafeoilquinicos, Apigenina, naringenina, acido cinámico.	Antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, antibacterial, incrementa nivel de GSH, fotoprotector.	Roby, Sarhan, Selim, & Khalel, 2013; Castro Restrepo et al., 2013; Calò, Visone, & Marabini, 2015 ^{27,76,85}
<i>Artemisia dracunculul</i> Asteraceae	Estragol, estragosido C, naringenina, pinocembrina, esculetina.	Antiinflamatorio, antipirético, antibiótico,	Aglarova, Zilfikarov, & Severtseva, 2008 ⁸⁸
<i>Matricaria chamomilla</i> Asteraceae	Apigenina, chamazuleno, ácido clorogénico, ácido cafeico, luteolina, Quercetina.	Antibacterial, Antioxidante, antiinflamatorio, actividad antienvjecimiento (disminuye perdida de agua transeptelial, suaviza arrugas)	Castro Restrepo et al., 2013, Wang & Tang, 2005, Jadoon et al., 2015 ^{85,89}
<i>Calendula officinalis</i> Asteraceae	Quercetina, carotenoides, rutina, sculetina, narcissin, kaempferol.	Antiinflamatorio, antitumoral, cicatrizante, antioxidante, despigmentante, antidematoso, anti fúngico, protector de radiación UVB	Ukiya, Akihisa, & Yasukawa, 2006; Akhtar et al., 2011; Muley, Khadabadi, & Banarase, 2009; Fonseca & Catini, 2010 ⁹⁰⁻⁹²
<i>Vaccinium meridionale</i> Ericaceae	Delfininida, cianidina, acidos cafeoilquinicos, derivados de quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico, miricetina.	Antiinflamatorio, actividad antioxidante	Vasco, Riihinen, Ruales, & Kamal-Eldin, 2009 ⁹³
<i>Smallanthus sonchifolius</i> Asteraceae	Tubérculos: fructosa, glucosa, fructo-oligosacáridos, triptófano, ácido clorogénico. Hojas: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, isómeros de ácidos dicafeoilquinicos.	Efectos hipoglucémicos(tubérculos), actividad antioxidante, efectos cito protectores	Yan et al., 1999; Simonovska, Vovk, Andrenšek, Valentová, & Ulrichová, 2003; Valentova, Cvak, Muck, Ulrichova, & Simanek, 2003; Valentová et al., 2006. ^{25,94,95}

2.2.1 Propiedades antioxidantes.

Dada la importancia biológica de las ROS durante el proceso de fotoenvejecimiento, y los daños que se generan en la matriz extracelular de la piel, la evaluación de la actividad antioxidante es fundamental en la búsqueda de especies con potencial efecto fotoprotector. Esta sección está orientada a la determinación de las propiedades antioxidantes, inicialmente del contenido de polifenoles totales (CPT)⁷⁰. Posteriormente a la determinación de las propiedades antioxidantes por metodologías que pueden explicar dos mecanismos diferentes por los cuales se produce la captación de radicales: ORAC (oxygen radical Absorbance Capacity) el cual ocurre por medio de la transferencia de un átomo de hidrogeno conocido como mecanismo HAT (Hydrogen Atom Transfer) y FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) cuyo mecanismo de acción es mediante la transferencia de un electrón, conocido como mecanismo SET (single electron-transfer).

2.2.1.1 Contenido de polifenoles totales

Los compuestos polifenólicos constituyen una de la familia de metabolitos secundarios más atrayentes en la industria de cosméticos para el cuidado de la piel, debido a la gran cantidad de actividades con las cuales han sido relacionados^{2,18,70,71,96}. Poseen importantes propiedades antioxidantes por lo cual se les otorga propiedades fotoprotectoras, además han sido ampliamente reportados como metabolitos inhibidores de enzimas y mecanismos que se desencadenan posteriores a la exposición de la radiación UV (Figura 3). Por tanto, la evaluación del contenido de polifenoles totales en extractos vegetales puede ser un indicio de potenciales ingredientes naturales para el cuidado de la piel. Así, se determinó el contenido de polifenoles totales -CPT- para los 56 extractos mediante el método de Folin ciocalteu, en la Tabla 3 se presentan los resultados. El CPT para los extractos varió en un rango de 2.86 a 227.96 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g extracto), presentando un comportamiento gaussiano, en el cual el mayor contenido de polifenoles totales para las 7 especies fue, en general, mayor en los extractos realizados con solventes de constante dieléctrica media, es decir los correspondientes a las mezclas acetona-agua,

mientras que los CPT bajos se evidenciaron en los extractos apolares (hexano-acetato de etilo) y polares (agua); este comportamiento era de esperarse debido a la naturaleza de los principales compuestos polifenólicos reportados en las plantas evaluadas, los cuales corresponden a flavonoides, ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos, compuestos con una gran cantidad de grupos hidroxilo y anillos aromáticos que les confieren propiedades medianamente polares (Tabla 2). Entre los 56 extractos evaluados, la especie que presentó el menor contenido de polifenoles totales corresponde a *S. sonchifolius*. Sus tubérculos no presentan valores por encima de 14.38 mg EAG/g extracto, lo cual se encuentra acorde con los reportes sobre ésta especie⁹⁷. Alrededor del 80% del peso seco de los tubérculos está compuesto por azúcares y derivados de fructosa y sacarosa⁹⁸. Por otro lado, las especies que presentaron mayor contenido de polifenoles totales corresponden a *T. vulgaris*, *R. officinalis* y *S. sonchifolius* (hojas) presentando valores superiores a 150 mg EAG/g extracto – en extractos de mezclas acetona agua- (Tabla 3).

2.2.1.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno -Valor ORAC

ORAC es uno de los métodos más empleados para determinar la actividad antioxidante basado en el mecanismo de transferencia de protón^{99,100}. Gracias al uso del área neta bajo la curva (ABC) (empleada para el tratamiento de los datos) que arroja la cinética de la reacción entre un radical peroxilo (originado por AAPH), la fluoresceína y la muestra a evaluar, se logran suprimir algunos errores que pueden generarse debido a la complejidad de las muestras. Además el método presenta una relevancia biológica alta debido a las condiciones (pH y temperatura) en la cuales ocurren la reacción⁹⁹. El uso del ABC unifica los tiempos de reacción siendo particularmente útil en muestras complejas como extractos vegetales, en los cuales muchos de sus componentes tienen diversos tiempos de reacción y por tanto diferentes cinéticas¹⁰⁰. La actividad antioxidante de los 56 extractos evaluada mediante la técnica ORAC, varió significativamente entre los extractos con diferencias de hasta 1000%, entre extractos hexánicos y los de mezclas acetona agua (caso específico de T1 y T4). La variación del valor ORAC entre las muestras es muy similar al comportamiento encontrado para el CPT, presentándose un menor valor ORAC en extractos apolares y encontrando valores máximos en los extractos realizados con mezclas acetona-agua.

Tabla 3. Propiedades antioxidantes y porcentaje de ponderación de plantas aromáticas y medicinales

Nombre científico	Solvente de extracción	Código	TPC	ORAC	FRAP	Ponderación
			mg EAG/g	μmol ET/g	μmol ET/g	% Actividad
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hexano	R1	64.44 ±1.76	672.79±16.82	453.51±16.08	21.78
	Acetato de etilo	R2	93.39±2.71	1320.49±19.51	602.92±11.29	33.59
	Acetona	R3	106.30±2.31	1615.44±9.25	556.73±18.54	37.21
	Acetona-agua (75-25%)	R4	197.99±19.24	3902.64±18.43	1466.23±53.37	83.12
	Acetona-agua (50-50%)	R5	203.14±9.49	3524.46±33.91	1597.16±91.93	82.73
	Acetona-agua (25-75%)	R6	124.27±3.12	1707.59±66.93	808.83±4.10	44.39
	Agua	R7	75.90±0.94	970.31±43.26	583.88±7.10	27.96
<i>Thymus vulgaris</i>	Hexano	T1	26.17±0.29	404.27±9.78	199.24±4.10	10.15
	Acetato de etilo	T2	100.77±1.54	1617.18±38.26	577.92±6.17	36.74
	Acetona	T3	140.59±4.98	2122.07±15.16	870.76±32.04	51.12
	Acetona-agua (75-25%)	T4	227.96±1.77	4050.33±33.48	2215.51±28.66	99.99
	Acetona-agua (50-50%)	T5	179.05±4.71	2898.48±77.76	1680.83±32.04	75.32
	Acetona-agua (25-75%)	T6	88.43±1.38	862.05±20.80	351.37±2.49	25.31
	Agua	T7	45.31±1.02	363.44±11.39	294.86±3.26	14.05
<i>Artemisia dracunculus</i>	Hexano	E1	4.47±0.31	99.82±6.76	24.14±3.67	1.84
	Acetato de etilo	E2	23.81±0.26	485.13±34.47	161.46±2.71	9.90
	Acetona	E3	27.10±0.29	537.00±44.36	167.71±5.16	10.90
	Acetona-agua (75-25%)	E4	21.97±0.49	314.49±20.63	125.47±2.54	7.69
	Acetona-agua (50-50%)	E5	20.73±0.80	413.07±12.73	124.38±3.42	8.30
	Acetona-agua (25-75%)	E6	19.24±0.58	413.74±14.57	89.88±1.18	7.57
	Agua	E7	17.84±0.45	366.90±19.32	79.69±2.32	6.83
<i>Calendula officinalis</i>	Hexano	C1	14.12±1.89	121.53±7.77	90.04±3.21	4.42
	Acetato de etilo	C2	24.96±1.48	191.05±4.15	101.75±2.44	6.75
	Acetona	C3	18.62±0.79	461.23±4.52	77.77±4.40	7.69
	Acetona-agua (75-25%)	C4	37.31±3.05	933.02±37.06	125.46±3.20	15.02
	Acetona-agua (50-50%)	C5	38.37±3.58	893.65±63.84	155.30±3.78	15.30
	Acetona-agua (25-75%)	C6	38.79±0.08	965.60±5.53	159.57±6.98	16.02
	Agua	C7	44.08±1.44	796.92±30.48	130.53±6.05	14.97

<i>Vaccinium floribundum</i>	Hexano	MR1	2.86±0.04	19.44±1.49	11.39±0.35	0.75
	Acetato de etilo	MR2	7.67±0.05	98.04±5.87	58.56±1.10	2.81
	Acetona	MR3	12.86±0.32	208.38±12.02	94.42±3.05	5.02
	Acetona-agua (75-25%)	MR4	26.11±0.69	388.40±21.77	170.95±18.46	9.59
	Acetona-agua (50-50%)	MR5	28.61±0.71	325.09±25.96	190.31±9.48	9.72
	Acetona-agua (25-75%)	MR6	22.25±0.68	259.52±5.54	153.72±6.23	7.70
	Agua	MR7	13.17±0.17	208.10±8.46	86.67±4.01	4.94
<i>Matricaria chamomilla</i>	Hexano	Z1	5.59±0.52	205.87±8.05	30.49±0.61	2.97
	Acetato de etilo	Z2	24.93±1.48	817.44±3.07	225.64±7.21	13.77
	Acetona	Z3	18.62±0.79	991.26±7.65	382.83±15.44	16.64
	Acetona-agua (75-25%)	Z4	37.31±3.05	1428.51±95.33	581.58±13.24	25.96
	Acetona-agua (50-50%)	Z5	38.37±3.58	1364.25±35.35	521.11±18.80	24.68
	Acetona-agua (25-75%)	Z6	38.79±0.08	723.18±11.51	242.16±5.59	15.26
	Agua	Z7	44.08±1.44	666.25±13.18	286.92±10.01	16.24
<i>Smallanthus sonchifolius</i> (<i>hojas</i>)	Hexano	HY1	3.35±0.07	67.99±5.38	27.97±0.69	1.47
	Acetato de etilo	HY2	20.99±1.31	199.52±3.17	137.14±8.13	6.77
	Acetona	HY3	18.37±0.63	239.48±1.23	172.64±5.04	7.25
	Acetona-agua (75-25%)	HY4	94.39±7.50	1547.06±41.54	641.39±16.18	36.18
	Acetona-agua (50-50%)	HY5	162.36±5.67	1904.17±62.30	1272.94±28.28	58.56
	Acetona-agua (25-75%)	HY6	142.10±3.36	1368.49±35.75	1010.24±10.28	47.24
	Agua	HY7	77.58±2.41	737.85±14.28	486.35±6.01	24.73
<i>Smallanthus sonchifolius</i> (<i>tubérculos</i>)	Hexano	TY1	4.88±0.17	60.20±1.21	31.75±1.39	1.69
	Acetato de etilo	TY2	9.24±0.40	109.55±2.82	81.94±3.20	3.48
	Acetona	TY3	4.42±0.44	80.33±1.99	41.98±1.39	1.94
	Acetona-agua (75-25%)	TY4	4.10±0.15	74.67±3.52	28.87±0.85	1.65
	Acetona-agua (50-50%)	TY5	5.02±0.14	73.39±3.60	31.75±0.32	1.82
	Acetona-agua (25-75%)	TY6	5.30±0.03	61.62±1.10	28.66±0.49	1.71
	Agua	TY7	14.38±0.11	99.93±4.74	36.33±0.98	3.47

Las especies que presentaron los menores valores ORAC fueron *S. sonchifolius* (tubérculos) 109.55 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$ (máximo valor), seguido de *V. meridionale* 388.40 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$ y *A. dracuncululus* 537 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$. Por otro lado, los extractos de mezclas acetona agua (75-25%) de *T. vulgaris* (4050.33 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$), *R. officinalis* (3902.64 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$) fueron los extractos de mayor relevancia ORAC. El hecho que hayan sido las especies con mayor CPT las que presenten el mayor valor ORAC, podría indicar que los polifenoles presentes son en gran medida, los responsables de la propiedad antioxidante presente en las muestras^{99,100}.

2.2.1.3 Poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP)

El poder de reducción del ion férrico es basado en el mecanismo de transferencia de electrones mediante la reducción de un complejo de hierro. Un complejo de hierro III TPTZ es usado como oxidante y el monitoreo del cambio de color corresponde a la transición entre Fe (III) y Fe (II) y la diferencia de ésta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de antioxidante. Aunque ésta es una metodología ampliamente usada para determinar propiedades antioxidantes, especialmente en compuestos tipo polifenólicos, no presenta una alta relevancia biológica debido a las condiciones de pH requeridas en la reacción (pH: 3.6)^{99,100}. Los valores FRAP de los 56 extractos evaluados se encontraron en rangos de 11.39 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$ (MR1) a 2215.51 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$ (T4). Se conserva la misma tendencia presentada en la determinación de los polifenoles totales, donde los extractos que mayor valor FRAP, son aquellos con mayor contenido de polifenoles totales T4, T5, R5, R4, HY5 y HY6 (2215.51, 1680.83, 1597.16, 1466.23, 1272.94 y 1010.24 $\mu\text{mol ET/ g extracto}$, respectivamente). En los resultados presentados en la tabla 3, se pueden encontrar algunas discrepancias entre los resultados ORAC y FRAP como es el caso de R2-R3, R4-R5, C3 y HY4-HY5. Lo anterior es una confirmación de los diversos mecanismos antioxidantes por los cuales se puede ejercer la captación de radicales por parte de las moléculas presentes, y la necesidad de evaluar varios métodos de forma simultánea.

2.2.2 Propiedades antienvjecimiento

La medición de las propiedades antienvjecimiento se llevó a cabo mediante la evaluación del efecto inhibitorio de los 56 extractos sobre tres blancos enzimáticos: colagenasa, elastasa e hialuronidasa, los cuales son enzimas claves que se encuentran altamente expresadas durante el proceso de fotoenvjecimiento y son las principales encargadas del daño en la matriz extracelular, tal como se ilustra en la Figura 3. Los extractos fueron evaluados a 100 µg/mL para las enzimas colagenasa e hialuronidasa y a 250 µg/mL para la enzima elastasa.. Los resultados de porcentaje de inhibición enzimática son mostrados en la Tabla 4.

El colágeno es el componente mayoritario del tejido conectivo de la piel y se considera como el principal bloque constructor de la dermis. Es responsable de la resistencia, elasticidad y flexibilidad de la piel. Durante el proceso del envjecimiento, principalmente aquel generado por la exposición a la radiación ultravioleta, los niveles de colágeno decrecen debido al incremento de la metaloproteinasa 1 (MMP-1) también conocida como colagenasa, por tanto la inhibición de ésta enzima podría desacelerar la formación de arrugas^{4,101}. Se evaluaron los 56 extractos provenientes de 7 especies a una concentración de 100 µg/mL, los resultados se muestran en la Tabla 4. Únicamente el extracto acuoso de *R. officinalis* presentó una inhibición de colagenasa superior al 50% y extractos de dos especies presentaron inhibición de esta enzima superior al 20% (*T. vulgaris* y *R. officinalis*). En los extractos evaluados no se presentó un comportamiento regular respecto a la inhibición de colagenasa y la polaridad de los solventes usados para hacer los extractos. Se presentaron, en general, bajas actividades en la inhibición de la enzima colagenasa a las concentraciones usadas, sin embargo, al observar una inhibición moderada en extractos de *R. officinalis* y *T. vulgaris* a tan solo 100 µg/mL, comparado con el control usado en este ensayo ácido Oleanólico el cual se usó a 250 µM para obtener una inhibición de 92.95%, se podría establecer que estas especies son promisorios ingredientes para el cuidado de la piel evitando la acción de la enzima colagenasa en la dermis.

Tabla 4. Propiedades anti-envejecimiento expresado en términos de % de inhibición, porcentajes de ponderación

Nombre científico	Solvente de extracción	Código	Anti-colagenasa	Anti-Elastasa	Anti-hialuronidasa	Ponderación
			100µg/ml*	250µg/ml**	100µg/ml***	
			% Inhibición	% Inhibición	% Inhibición	% Actividad
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hexano	R1	nd	25.08±0.80	3.19±1.06	9.42
	Acetato de etilo	R2	24.05±1.47	70.41±0.01	6.12±3.41	33.52
	Acetona	R3	26.06±2.32	69.73±2.23	11.97±3.09	35.92
	Acetona-agua (75-25%)	R4	12.84±1.35	24.45±2.26	2.48±0.61	13.26
	Acetona-agua (50-50%)	R5	nd	7.23±5.61	2.39±2.76	3.21
	Acetona-agua (25-75%)	R6	38.10±0.17	10.79±0.75	100.00±0.00	49.63
	Agua	R7	58.10±1.47	9.79±4.24	4.65±3.37	24.18
<i>Thymus vulgaris</i>	Hexano	T1	nd	nd	nd	2.50
	Acetato de etilo	T2	4.34±1.62	nd	nd	1.67
	Acetona	T3	4.12±0.77	nd	nd	3.76
	Acetona-agua (75-25%)	T4	12.37±0.44	17.79±7.07	nd	10.63
	Acetona-agua (50-50%)	T5	24.11±0.93	15.79±0.19	nd	13.92
	Acetona-agua (25-75%)	T6	25.52±2.93	nd	100.00±0.00	43.17
	Agua	T7	19.69±1.12	nd	100.00±0.00	40.07
<i>Artemisia dracunculus</i>	Hexano	E1	nd	4.51±1.46	nd	1.95
	Acetato de etilo	E2	nd	nd	nd	0.18
	Acetona	E3	nd	nd	2.93±1.02	0.98
	Acetona-agua (75-25%)	E4	nd	12.79±0.08	3.19±2.13	5.33
	Acetona-agua (50-50%)	E5	nd	nd	1.06±0.87	0.35
	Acetona-agua (25-75%)	E6	nd	nd	nd	0.00
	Agua	E7	nd	nd	nd	0.27
<i>Calendula officinalis</i>	Hexano	C1	nd	nd	1.56±0.00	0.52
	Acetato de etilo	C2	nd	nd	3.39±5.52	1.13
	Acetona	C3	nd	nd	2.60±0.60	0.87
	Acetona-agua (75-25%)	C4	nd	1.57±0.14	1.30±0.52	0.96
	Acetona-agua (50-50%)	C5	nd	nd	nd	1.58
	Acetona-agua (25-75%)	C6	nd	nd	nd	0.61
	Agua	C7	nd	nd	2.08±1.34	0.69

<i>Vaccinium floribundum</i>	Hexano	MR1	5.58±1.41	nd	nd	2.03
	Acetato de etilo	MR2	nd	nd	nd	0.00
	Acetona	MR3	nd	nd	nd	0.26
	Acetona-agua (75-25%)	MR4	2.17±1.32	4.46±1.60	nd	2.21
	Acetona-agua (50-50%)	MR5	nd	15.59±0.00	4.17±2.41	6.58
	Acetona-agua (25-75%)	MR6	nd	13.16±1.55	0.78±0.52	4.65
	Agua	MR7	nd	nd	nd	1.26
<i>Matricaria chamomilla</i>	Hexano	Z1	nd	nd	nd	0.13
	Acetato de etilo	Z2	nd	nd	nd	0.00
	Acetona	Z3	nd	nd	nd	0.00
	Acetona-agua (75-25%)	Z4	nd	nd	3.65±0.60	1.22
	Acetona-agua (50-50%)	Z5	nd	nd	nd	0.26
	Acetona-agua (25-75%)	Z6	nd	nd	2.34±1.31	0.78
	Agua	Z7	nd	nd	nd	0.17
<i>Smallanthus sonchifolius</i> (hojas)	Hexano	HY1	nd	nd	nd	0.00
	Acetato de etilo	HY2	1.75±0.50	nd	nd	0.70
	Acetona	HY3	3.37±1.92	nd	nd	1.32
	Acetona-agua (75-25%)	HY4	nd	nd	nd	0.00
	Acetona-agua (50-50%)	HY5	8.44±2.30	nd	86.21±3.09	31.55
	Acetona-agua (25-75%)	HY6	15.83±3.07	nd	88.32±2.70	34.71
	Agua	HY7	nd	nd	100.00±0.00	33.33
<i>Smallanthus sonchifolius</i> (tubérculos)	Hexano	TY1	nd	nd	nd	0.62
	Acetato de etilo	TY2	nd	nd	4.44±1.60	1.48
	Acetona	TY3	nd	nd	3.74±1.08	1.25
	Acetona-agua (75-25%)	TY4	nd	nd	nd	0.55
	Acetona-agua (50-50%)	TY5	nd	nd	nd	0.08
	Acetona-agua (25-75%)	TY6	nd	nd	nd	0.31
	Agua	TY7	nd	nd	nd	0.76

Controles positivos expresados en porcentaje de inhibición

*Ácido Oleanólico (250 µM): 92.95±3.53%

**Ácido Oleanólico (500 µM): 80.42±4.60%

***EGCG (100 µM): 69.30±4.04%

Las fibras de elastina hacen parte de las proteínas que conforman la ECM, constituye un 2-4% del volumen seco de la dermis y como su nombre lo indica es la encargada de las características de elasticidad y resistencia de la piel. A pesar de ser sintetizada únicamente en el periodo fetal y los primeros años de vida, se encuentra drásticamente afectada con el paso de los años. El daño presentado en esta proteína es principalmente debido a la acción de la enzima elastasa. En este estudio enfocado en la protección de los componentes principales de la ECM, se evaluó la actividad inhibitoria de los 56 extractos sobre la enzima elastasa proveniente de páncreas porcino. Los resultados son presentados en la Tabla 4. Los extractos de *R. officinalis* realizados con solventes de baja polaridad presentaron una actividad inhibitoria sobre la enzima elastasa del 70.41% para el extracto en acetato de etilo y 69.73% para el extracto en acetona considerando estos extractos como activos comparado con el control usado en este ensayo, ácido Oleanólico que empleado a una concentración de 500 μ M presenta un porcentaje de inhibición de 80%. Éste resultado se presenta acorde con reportes previos los cuales indican que el aceite esencial de romero presenta inhibición a la enzima elastasa^{102,103}. Otros 8 extractos pertenecientes a *R. officinalis*, *T. vulgaris*, *A. dracunculus* y *V. meridionale* presentaron inhibiciones entre 25% y 10%, sin embargo, no se representa como una actividad significativa de inhibición sobre elastasa.

La hialuronidasa es una enzima endolítica cuya principal función es depolimerizar el ácido hialurónico, lo que conlleva a una pérdida gradual de la humectación, pérdida de volumen, firmeza en la piel y a la disgregación de la ECM. El catabolismo del ácido hialurónico por acción de la hialuronidasa estimulada por la radiación UVB es uno de los principales factores involucrados en el fotoenvejecimiento de la piel^{2,8}. Su inhibición se considera como un blanco importante para mantener los niveles de ácido hialurónico y la retención de humedad en la piel^{63,104}. Los resultados de la inhibición de hialuronidasa de los 56 extractos evaluados se presentan en la tabla 4. Seis de los extractos polares de las especies *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* (hojas) presentaron una alta inhibición de la enzima hialuronidasa >85%, de los cuales el extracto en acetona-agua 25-75% de *R. officinalis* y *T. vulgaris* y los extractos acuosos de *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* (hojas) presentaron inhibiciones del 100%, valores muy superiores al presentado por el control EGCG (100 μ M) el cual generó una

inhibición del 69% sobre la enzima elastasa. En la búsqueda de ingredientes naturales contra el envejecimiento de la piel, encontrar extractos que presenten tales inhibiciones en una enzima que genera pérdida de humectación en la piel y por tanto la disgregación de la matriz funcional de la dermis es de suma importancia. Varios reportes en los cuales se evalúa la inhibición de la enzima hialuronidasa, como es el caso de la especie *Terminalia*¹⁰⁵ que inclusive a concentraciones de 250µg/mL no superan el 90%, o inclusive la especie *Camelia sinensis* (té verde)⁸³ un reconocido ingrediente natural por sus propiedades anti-envejecimiento y antioxidante no presenta efectos sobre la inhibición de esta enzima, por lo tanto es de resaltar la importancia y la potencialidad de estas especies en el campo de ingredientes anti-envejecimiento

2.2.3 Ponderación de actividades y selección de especies biológicamente más activas

Aunque estas especies poseen una gran cantidad de reportes de bioactividad, inclusive muchas de ellas con enfoques fotoprotectores^{27,42,106-108,92}, de hecho algunas de las especies son usadas como ingredientes naturales para productos cosméticos¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, hasta el momento no se ha realizado sobre ellas un estudio integrado basado en diversos mecanismos del proceso de fotoenvejecimiento. Con base en los resultados anteriores (Tablas 3 y 4), se procedió a realizar un estudio de ponderación de los 56 extractos con base en los resultados antioxidantes y los resultados enzimáticos. Un análisis de ponderación fue desarrollado con los 56 extractos, dando a cada una de las variables (ORAC, FRAP y CPT) el mismo valor (33.33%). Se empleó la ecuación 4 para la determinación de los porcentajes en la ponderación final. Las propiedades antioxidantes para cada extracto se presentan en la tabla 3.

$$\% \text{ Ponderación} = \left(\frac{ORAC_M}{ORAC_{>M}} \times 0.33 \right) + \left(\frac{FRAP_M}{FRAP_{>M}} \times 0.33 \right) + \left(\frac{CPT_M}{CPT_{>M}} \times 0.33 \right) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde ORAC_M, FRAP_M y CPT_M corresponden al valor ORAC, valor FRAP y contenido de polifenoles totales de cada muestra (extracto). ORAC_{>M}, FRAP_{>M} y CPT_{>M} corresponden a la muestra que mayor valor haya dado en cada una de las pruebas: T4 para ORAC, FRAP y CPT. Lo anterior con el fin de normalizar las muestras y generar una comparación intramuestral

Con el objetivo de identificar los extractos más promisorias según sus propiedades antienviejecimiento y protectoras sobre los componentes de la matriz extracelular, de manera similar que para las actividades antioxidantes se realizó un análisis de ponderación para las tres variables (colagenasa, elastasa, hialuronidasa) en el cual se otorgó el mismo porcentaje 33.33% y usando 100% de inhibición para la normalización de los resultados como se expresa en la ecuación. Los porcentajes de inhibición enzimática en términos de la ponderación se presentan en la tabla 4.

$$\% \text{ Ponderación} = \left(\% I_{col} \frac{33.33}{100} \right) + \left(\% I_{elas} \frac{33.33}{100} \right) + \left(\% I_{hial} \frac{33.33}{100} \right) \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde %I_{col}, %I_{elas}, %I_{hial} corresponde a los porcentajes de inhibición que presentaron los extractos para las enzimas colagenasa, elastasa e hialuronidasa respectivamente.

Gráficamente la ponderación se presenta en la Figura 7. El comportamiento encontrado en los extractos evaluados varía significativamente entre las evaluaciones de propiedades antioxidantes y las enzimáticas intra-muestra. Sin embargo, en el análisis inter-muestras, se revela un comportamiento homogéneo con respecto a las propiedades antioxidantes, en el cual los extractos acetona-agua presentan un mayor porcentaje de actividad antioxidante presentando un comportamiento tipo gaussiano. Por otro lado, se presentan las ponderaciones gráficas de las actividades enzimáticas, donde claramente se presentó una menor relevancia por parte de las especies evaluadas y no se observa un comportamiento homogéneo entre los extractos. Es importante resaltar que la actividad obtenida para los extractos polares de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* (hojas) y los extractos apolares de *R. officinalis*, presentaron la mayor actividad inhibitoria sobre las enzimas evaluadas, lo cual sugiere que los compuestos responsables de la actividad antioxidante, no necesariamente son los responsables de la inhibición enzimática. Lo anterior sin sesgar la posibilidad de que los anteriores extractos puedan tener propiedades fotoprotectoras de la ECM.

Con el propósito de identificar los extractos más activos direccionado a determinar su importancia en cuanto a la capacidad de captación de radicales e inhibición enzimática, se realizó un análisis estadístico de componentes principales PCA (Figura 8). Este análisis

permite representar una tabla de datos multivariados en un espacio de baja dimensionalidad, mostrando variables latentes que resumen los patrones sistémicos de variación entre los datos¹⁰⁹. En alusión a esta sección, se representan cada uno de los 56 extractos evaluados y los resultados de los ensayos biológicos evaluados. Con éste análisis estadístico únicamente se pretende generar una discriminación y agrupamiento de las muestras basadas en los diferentes resultados de actividad biológica.

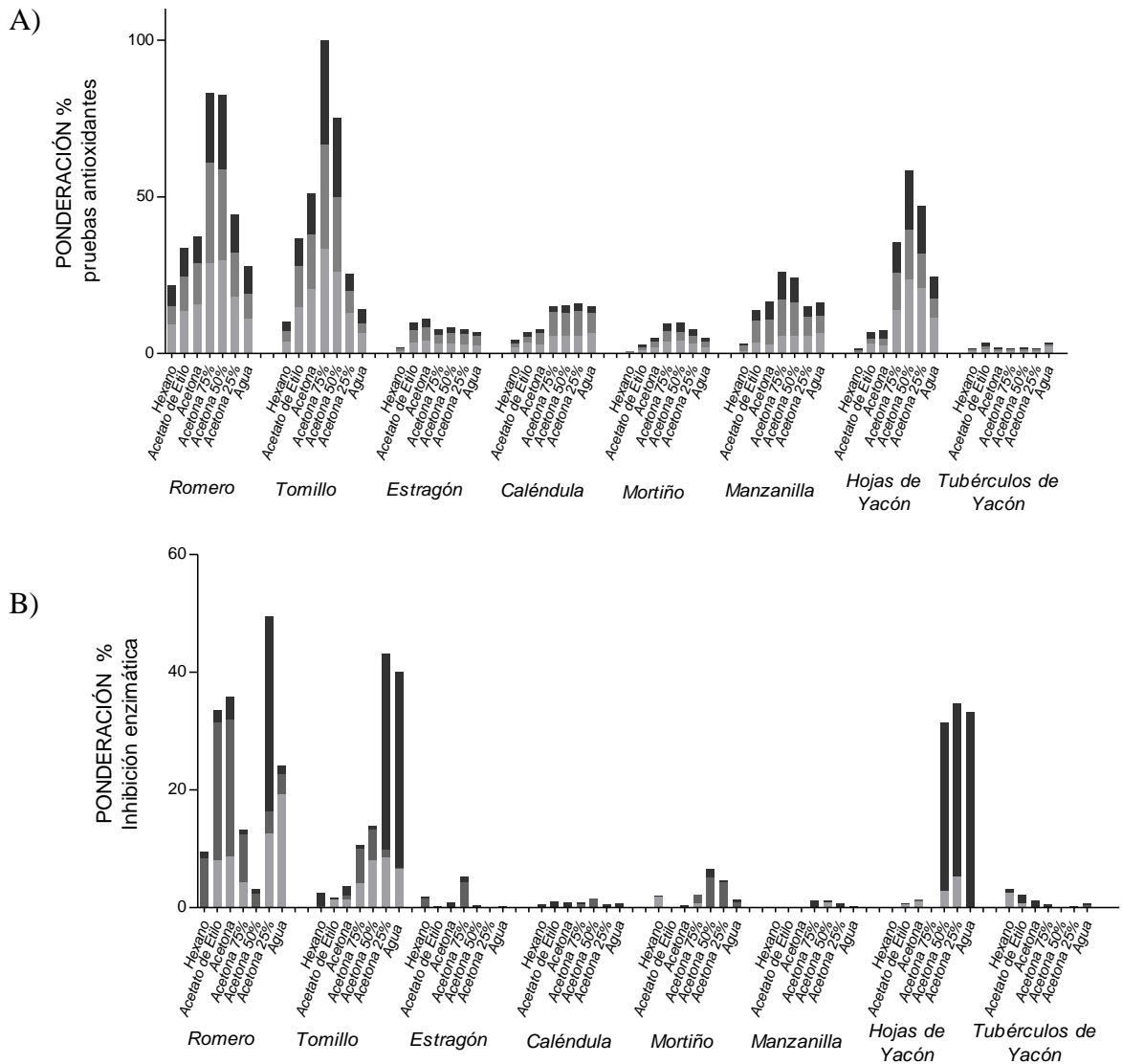


Figura 7. Ponderación gráfica de las pruebas biológicas evaluadas a) pruebas antioxidantes en orden ascendente: CPT, ORAC, FRAP; b) Pruebas de inhibición enzimática en orden ascendente: Anti-colagenasa, anti-elastasa, anti-hialuronidasa.

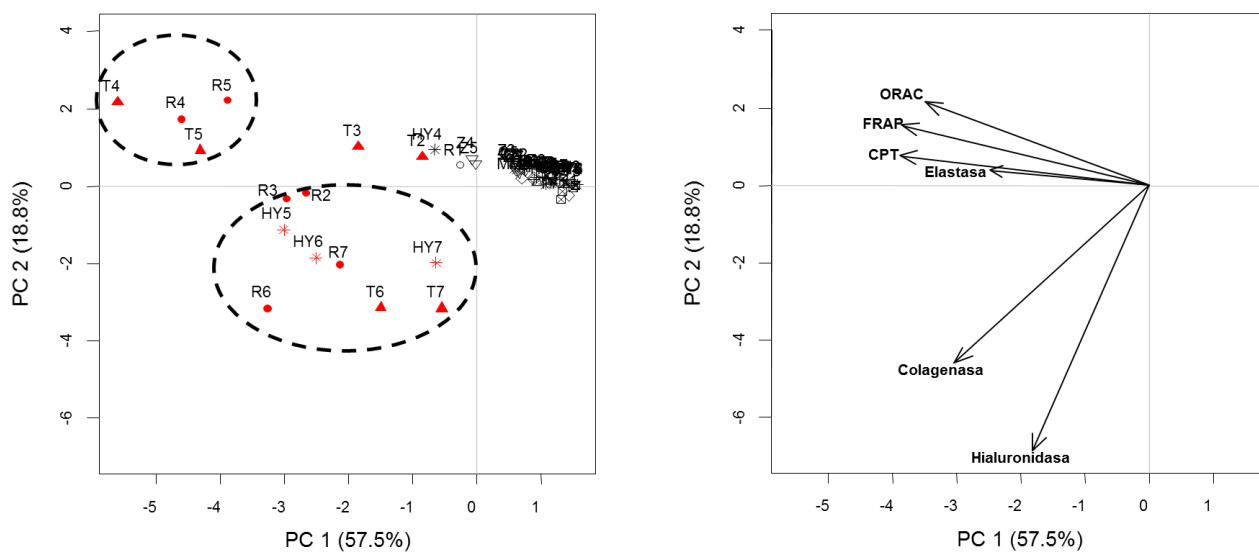


Figura 8. Componentes principales extractos y pruebas biológicas.

En el análisis de componentes principales, se realizó una clasificación de las muestras según su contenido de polifenoles totales, debido a la importancia biológica que se reportan sobre estos metabolitos en relación a sus propiedades anti-envejecimiento. En rojo, se presentan los extractos que mayor contenido de polifenoles presentaron (>75 mg EAG/g de extracto). Aunque la Figura 7 no muestra un comportamiento uniforme entre los resultados de actividad antioxidante e inhibición enzimática para una misma muestra, según el análisis de PCA, los extractos seleccionados con mayor contenido de polifenoles totales son los que presentan mayor peso sobre los dos componentes resultantes, los cuales logran explicar un 76.3% de la varianza total de las muestras. En el análisis se logra agrupar de manera clara 3 clusters: el grupo del cuadrante II, en el cual están los extractos T4, T5, R4, R5 y los vectores correspondientes las pruebas antioxidantes ORAC, FRAP y CPT. Éste resultado es consistente con los resultados de ponderación obtenidos, los cuales indican que los extractos con mayor contenido de polifenoles totales de todas las muestras evaluadas, fueron aquellos que presentaron los valores más altos de ORAC y FRAP. Para un mayor soporte, en la Tabla 5, se encuentran los valores de correlación de Pearson que puede ir desde 1 a -1. Mientras el valor se acerque más a 1, mayor correlación entre las variables existe. Se presenta entonces valores de correlación > 0.9 entre CPT- ORAC y CPT-FRAP, lo que permite sugerir que son

los compuestos polifenólicos presentes en las muestras, los responsables principales de las propiedades antioxidantes que se presentan. El segundo clúster se encuentra en el cuadrante III. En éste grupo se encuentran los ensayos enzimáticos anti-colagenasa y anti-hialuronidasa y las muestras acetona-agua 25-75 y acuosos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*. Así es posible determinar que los extractos más polares de estas tres especies presentan un efecto mayor en las actividades de inhibición enzimática, a pesar de no presentar una alta correlación con las actividades antioxidantes. Los resultados indican que no solo los compuestos tipo polifenólicos pueden presentar efectos sobre la actividad inhibitoria de las enzimas evaluadas (ver tabla 3 y tabla 4). El tercer clúster se encuentra sobre el cuadrante I y no representa un peso significativo en ninguno de los dos componentes, ni tampoco en cuanto a las actividades biológicas observadas.

Tabla 5. Coeficientes de correlación de Pearson CPT vs ORAC, FRAP, colagenasa, elastasa e hialuronidasa.

Coeficiente de correlación de Pearson				
ORAC	FRAP	Colagenasa	Elastasa	Hialuronidasa
0.9435	0.9619	0.4634	0.371	0.3366

Los polifenoles totales son moléculas claves dentro de los procesos biológicos que se evaluaron en este estudio, aunque las correlaciones entre CPT y las actividades de inhibición enzimática no fueron altas, mediante el PCA fue posible determinar que únicamente aquellos extractos que presentaron un valor > 75 mg EAG/ g, exhibieron un peso significativo sobre los compontes y sobre las actividades biológicas. Con los resultados anteriores se puede concluir que las especies *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* pueden considerarse como potenciales fuentes de ingredientes naturales protectores de los principales componentes de la ECM.

3 CAPITULO III

EFEECTO FOTOPROTECTOR DE PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES SELECCIONADAS SOBRE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

La radiación UV hace parte del espectro electromagnético con longitudes de onda entre 200 y 400 nm. Se encuentra dividida en tres categorías dependiendo de la longitud de onda, longitud de onda corta UVA (320-340 nm), longitud media UVB (280-320), y longitud corta UVC (200-280 nm). Más del 90% de la radiación solar que llega a la tierra es UVA, ésta longitud de onda larga es considerada como “los rayos del envejecimiento” debido a que pueden penetrar la epidermis y la dermis de la piel. La radiación UVB es conocida como “rayos quemadores” y son únicamente el 4 o 5 % de la radiación UV, sin embargo la radiación UVB es la longitud de onda más activa de la radiación UV. Esta radiación es 1000 veces más potente para causar quemaduras y es más genotóxica que la radiación UVA, siendo responsable de la sobre-expresión de especies reactivas de oxígeno (ROS), a pesar de penetrar casi en su mayoría la epidermis^{27,110}.

La exposición a las radiaciones UV de manera crónica y repetitiva, genera alteraciones cutáneas a nivel macro y microscópico lo que se conoce como fotoenvejecimiento de la piel. El fotoenvejecimiento se caracteriza por la formación de arrugas profundas, pérdida de humectación, elasticidad y fuerza en la piel¹¹¹. Las ROS producidas como consecuencia de la exposición a la radiación UV (especialmente UVB), resulta en la subsecuente activación de una compleja ruta de señalización, seguido por la inducción de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) en las células dérmicas e inhibición de la síntesis de pro-colágeno en los tejidos conectivos de la matriz extracelular¹¹².

Este capítulo describe las propiedades fotoprotectoras de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*, basados en la cascada de señalizaciones y reacciones celulares ante el estímulo de la radiación UVB. En este sentido, son usados fibroblastos dérmicos humanos para la medición en la producción de MMP-1, pro-colágeno y ROS intracelular cuando son sometidos al estímulo de la radiación UVB, con y sin la presencia de los extractos seleccionados.

3.1 MATERIALES Y METODOS

3.1.1 Cultivo de fibroblastos dérmicos humanos y tratamiento con los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*

Fibroblastos dérmicos humanos (HDFa) aislados de piel humana adulta fueron adquiridos de la compañía life technologies (USA), al igual que los demás reactivos para el cultivo celular. Para los experimentos de fotoprotección se usaron 2-5 pasajes. Las células fueron puestas en frascos de cultivo de 75 mL y cultivadas en medio DMEM-F12 con Glutamax, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y los antibióticos penicilina 100 U/mL – estreptomicina 100 µg/ mL. El cultivo celular fue mantenido a 37°C en atmosfera humidificada con 5% CO₂. El cambio de medio se realizó cada 48h. Los HDF fueron despegados de los frascos de cultivo cuando estos se encontraban al 90% de confluencia usando una solución de Tripsina (0.1%) –EDTA (0.01%) y traspasados a platos de 96 pozos (1 x 10⁴) con medio suplementado e incubados durante toda la noche. Luego las células fueron pre tratadas con los extractos (R4, R6, T4, T6, HY5 y HY7) en medio sin SFB. 24h después las células fueron lavadas 2 veces con buffer fosfato salino (PBS) y se adicionaron 100 µL de medio fresco sin SFB e inmediatamente los HDF fueron irradiados bajo radiación UVB. Los sobrenadantes fueron obtenidos, para determinar la producción de MMP-1 y pro-colágeno. A cada ensayo se le realizó el ensayo de viabilidad celular WST-8 usando las células adheridas a los pozos.

3.1.2 Irradiación UVB

Los HDF pre tratados durante 24 h con o sin extractos en medio sin SFB, fueron lavados 2 veces con PBS y se adicionó medio fresco sin SFB. Seguido, los platos de cultivo fueron irradiados con radiación UVB (312 nm) entre 25 y 200 mJ/cm², usando el sistema de radiación uniforme UV Bio-Sun (Vilber Lourmat com.; Francia) monitoreado mediante el software Bio-sun. Todas las irradiaciones se llevaron a cabo bajo una capa fina (100 µL) de medio de cultivo sin SFB. Para cada ensayo se realizaron blancos sin células y sometidas a las mismas condiciones experimentales.

3.1.3 Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad del cultivo celular de HDF fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico WST-8 (Dojindo molecular technologies Inc.; USA). El ensayo WST-8 consiste en la reducción, por deshidrogenasas celulares, de una sal de Tetrazolio soluble en agua, 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, para formar un aducto de formazán de color amarillo soluble en medio de cultivo, el cual puede monitorearse espectrofotométricamente a 450 nm. La cantidad de formazán generada por la actividad de deshidrogenasas en las células, es directamente proporcional al número de células vivas. Para la medición de la viabilidad celular, se evaluaron los extractos a concentraciones entre 2.5 y 200 $\mu\text{g/mL}$ y diferentes dosis de radiación. El medio fue removido (almacenado o descartado según el caso), las células adheridas son usadas para los ensayos de viabilidad celular lavándolas dos veces con PBS, posterior adición de 100 μL de medio sin SFB y 10 μL del reactivo WST-8 a cada pozo. El plato se incubó durante 2h a 37°C, con atmosfera humidificada y 5% CO_2 . La absorbancia fue medida a 450 nm empleando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (BioTek instruments, Inc.; Winooski USA).

3.1.4 Determinación de la producción de MMP-1 mediante kit ELISA

La medición de la producción de MMP-1 en el medio de cultivo fue determinada mediante la técnica ELISA, empleando el kit de ensayo MMP-1 humana total DuoSet Kit de ELISA (R&D Systems.; USA). Inicialmente se determinaron las intensidades de radiación UVB y el tiempo post-irradiación adecuados para la medición de la concentración de MMP-1 en el medio de cultivo, para lo cual se emplearon intensidades UVB de 25, 50, 100 y 200 mJ/cm^2 a tiempos post-irradiación de 24, 48 y 72 h. Una vez determinadas las condiciones óptimas de ensayo se pre-trataron las células con los extractos a una concentración final en cada pozo de 2.5 $\mu\text{g/mL}$. 24h después de adicionados los extractos en las células, éstas fueron lavadas con PBS dos veces, luego se adicionaron a cada pozo 115 μL de medio fresco sin SFB y los HDF fueron estimulados con radiación UVB (100 mJ/cm^2). Los platos fueron incubados a 37°C en atmosfera humificada y CO_2 al 5% durante 72h. La concentración de MMP-1 fue

determinada siguiendo las instrucciones del fabricante y usando como controles positivos EGCG y Quercetina a una concentración de 25 μM .

3.1.5 Determinación de la producción de pro-colágeno tipo I mediante ELISA

La medición de la producción de pro-colágeno en el medio de cultivo fue determinada mediante la técnica ELISA, empleando el kit de ensayo pro-colágeno $\alpha 1$ humano DuoSet kit de ELISA (R&D Systems.; USA). Inicialmente se determinaron las intensidades de radiación UVB y el tiempo post-irradiación adecuados para la medición de la concentración de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ en el medio de cultivo, para lo cual se emplearon intensidades UVB de 25, 50, 100 y 200 mJ/cm^2 a tiempos post-irradiación de 24, 48 y 72 h. Una vez determinadas las condiciones óptimas de ensayo se pre-trataron las células con los extractos a una concentración final en cada pozo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 24h después de adicionados los extractos en las células, éstas fueron lavadas con PBS dos veces, luego se adicionaron a cada pozo 115 μL de medio fresco sin SFB y los HDF fueron estimulados con radiación UVB (100 mJ/cm^2). Los platos fueron incubados a 37°C en atmosfera humificada y CO_2 al 5% durante 72h. La concentración de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ fue determinada siguiendo las instrucciones del fabricante y usando como controles positivos EGCG y Quercetina a una concentración de 25 μM .

3.1.6 Detección de la generación de ROS intracelular

La medición de la producción de ROS intracelular se realizó siguiendo una metodología descrita previamente¹¹³ con algunas modificaciones⁵⁵. Para la medición de ROS se empleó 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (molecular Probe Inc.; USA), el cual es deacetilado al producto no fluorescente DCFH mediante esterasas intracelulares, que es posteriormente oxidando por ROS intracelulares al producto fluorescente DCF. Para la determinación de ROS, HDF (5×10^4 por cada pozo) fueron puestos en platos negros de 96 pozos sin SFB e incubados a 37°C, 5% CO_2 durante toda la noche. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS 2 veces e incubadas a 37°C y 5% CO_2 con 90 μL de extractos en medio de cultivo sin SFB a concentraciones finales de 2.5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 2 h. Una

vez culminado el tiempo de la incubación, se adiciona a cada pozo 10 μ L de DCFH-DA y nuevamente se incuban los platos durante 45min. Luego, los HDF fueron irradiados con UVB a una intensidad de 200 mJ/cm^2 e incubados durante 1 h. Finalmente la fluorescencia fue medida a 485 nm_{ex} / 520 nm_{em} empleando un lector de microplatos multimodal Synergy HT (BioTek Instruments, Inc.; USA). La generación de ROS intracelular es proporcional al incremento de la fluorescencia respecto a las células no irradiadas.

3.1.7 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de comparaciones múltiples mediante el test de Tukey para determinar diferencias significativas entre muestras y controles.

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para los ensayos celulares con enfoque en la fotoprotección se seleccionaron los extractos acetona-agua 75-25% y acetona agua 25-75% de *R. officinalis* y *T. vulgaris* y los extractos acetona-agua 50-50% y acuoso de las hojas de *S. sonchifolius*, toda vez que presentaron la mayor actividad biológica en cuanto a propiedades antioxidantes y antienvjecimiento, esta última medida como la capacidad para inhibir enzimas relacionadas con el proceso de envejecimiento. Estos resultados se mostraron y explicaron en el capítulo II de éste trabajo.

3.2.1 Efecto de los extractos sobre la viabilidad de fibroblastos dérmicos humanos

El efecto citotóxico de los extractos de *T. vulgaris* y *R. officinalis* obtenidos con acetona acuosa al 75% y del extracto de hojas de *S. sonchifolius*, obtenido con acetona acuosa al 50% sobre HDF después de 24 h de tratamiento, se determinó por el método WST-8. Para la evaluación del efecto de los extractos sobre la viabilidad de los HDFa, los extractos fueron evaluados en un rango de concentraciones entre 2.5 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y los resultados se muestran en la Figura 9. Concentraciones de extracto de *R. officinalis* inferiores a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no presentaron ningún efecto tóxico sobre la viabilidad de HDF, por su parte, los extractos de

T. vulgaris y *S. sonchifolius* no presentaron toxicidad para los HDF a concentraciones menores a 10 µg/mL. Para las tres especies el uso de concentraciones superiores a los valores definidos atrás presenta altos porcentajes de citotoxicidad: 91% para *R. officinalis* a 10 µg/mL, 84% y 50% para *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* a 20 µg/mL respectivamente. Concentraciones de 2.5 µg/mL de ambas especies, incrementaron más del 40% la viabilidad con respecto a las células no tratadas, sugiriendo por tanto, una posible acción en la cicatrización de heridas por su efecto positivo en la proliferación de HDF. El extracto de yacón presentó el menor efecto tóxico sobre los HDF ya que concentraciones inferiores a 10 µg/mL no mostraron ningún perturbador sobre la viabilidad celular. No obstante, concentraciones inferiores de esta especie, no mostraron efecto sobre la proliferación celular.

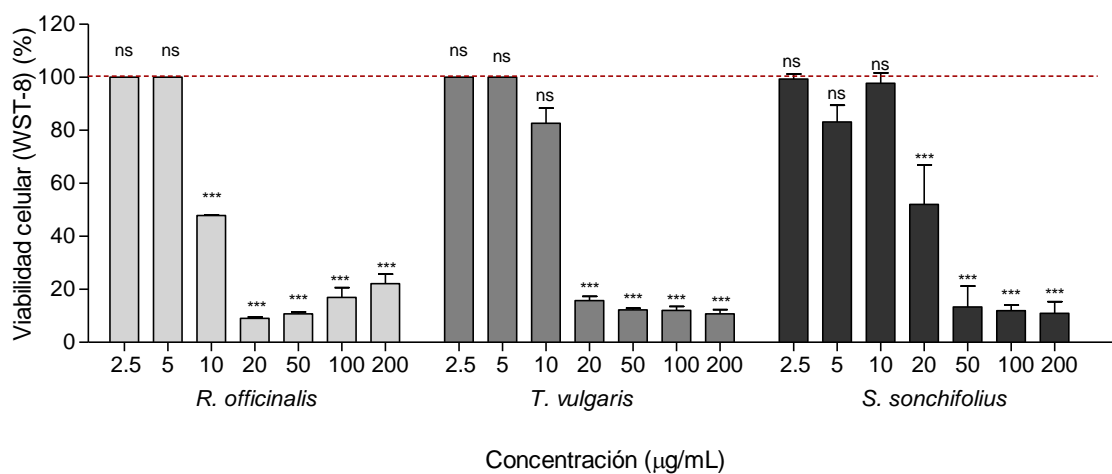


Figura 9. Efectos de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* sobre la Viabilidad celular. La viabilidad celular de los fibroblastos en pretratamiento con extractos acetona-agua 75-25% de *R. officinalis* y *T. vulgaris* y extracto acetona-agua 50-50% de hojas de *S. sonchifolius* fue medido mediante el ensayo WST-8. Los fibroblastos fueron tratados con extractos durante 24 h a concentraciones desde 2.5 a 200 µg/mL. Todos los datos son mostrados como el promedio ± S.D de tres replicas independientes del ensayo. *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0001, nsp>0.05 comparado con el control correspondiente a un 100% de viabilidad celular (no mostrado en la gráfica) determinado por ANOVA one way y el test de Tukey.

Aunque en general se observó un comportamiento dosis-dependiente, algunos resultados se presentaron anómalos como el caso de *S. sonchifolius* a 5 µg/mL, el cual presentó una

viabilidad más baja que a 10 $\mu\text{g/mL}$. Lo anterior probablemente sea el resultado de las fallas propias de éste ensayo de viabilidad celular, encargado de determinar la función mitocondrial de las células. A pesar de ser uno de los ensayos de viabilidad celular de mayor sensibilidad y más usados para éste tipo de células¹¹⁴, este se evalúa con células aun adheridas al plato de cultivo.

Además de requerirse un rango de concentraciones no tóxicas para los HDF en los cuales los extractos pudiesen ser evaluados, se requiere determinar las condiciones de irradiación óptimas para los fibroblastos, que pudiesen generar un estímulo, sin presentarse como tóxica para los mismos HDF. Para ello se evaluó la viabilidad celular mediante WST-8 cuando los HDF fueron sometidos a diferentes intensidades de radiación UVB (25, 50, 100, 200 y 400 mJ/cm^2) y a 24 y 48 h posteriores a la irradiación. Para la radiación UVB se encuentran picos máximos de intensidades entre las 12:00 pm y la 1:00 pm con valores de hasta 40 $\mu\text{W/cm}^2$, por tanto una intensidad de 200 mJ/cm^2 correspondería a 55 veces la exposición presentada entre las 12:00 y la 1:00pm¹¹⁵. Los resultados de la viabilidad celular ante la exposición a radiación UVB son presentados en la Figura 10.

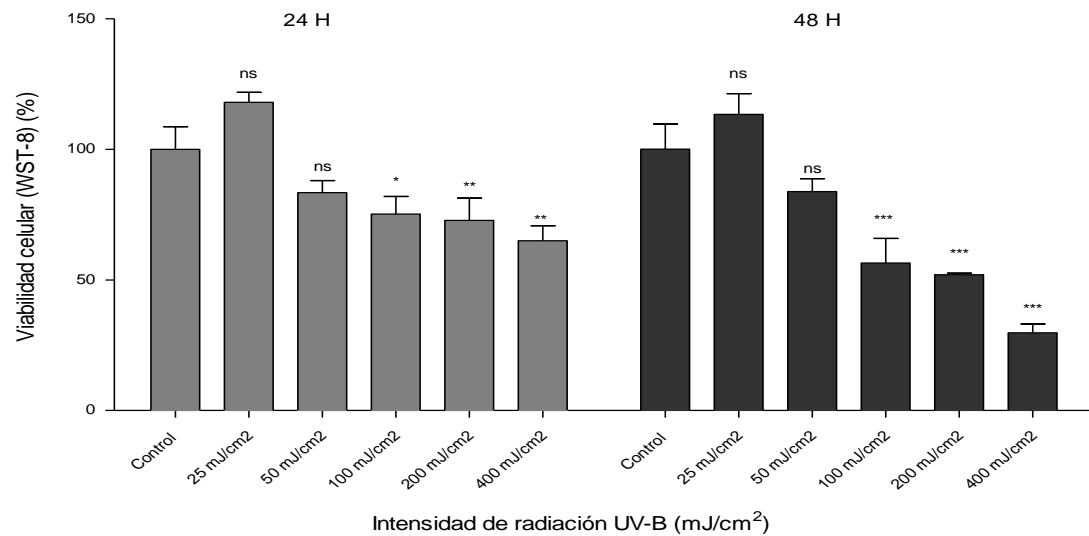


Figura 10. Efecto de la radiación UVB en la viabilidad celular de HDF. Los fibroblastos fueron irradiados con radiación UVB entre 25-400 mJ/cm^2 , posterior a una incubación de 24 o 48 h se determina la viabilidad celular mediante WST-8. Todos los datos son mostrados como la media \pm S.D de tres replicas independientes del ensayo. P valor < 0.0001, * $p < 0.05$,

** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$, ^{ns} $p > 0.05$ comparado con el respectivo control determinado por ANOVA one way y aplicando el postest de Tukey.

La viabilidad de los fibroblastos dérmicos posterior a la exposición UVB fue medida mediante el ensayo WST-8. Como control se usaron células sin irradiar bajo las mismas condiciones experimentales de incubación y cambios de medio. Los resultados de ambos tiempos post irradiación se presentan de manera dosis y tiempo dependientes, disminuyendo la viabilidad celular con el incremento de la intensidad en la irradiación y con el tiempo de incubación. Transcurridas 24 h de incubación post-irradiación, se presentó una viabilidad mínima de 65% para una irradiación de 400 mJ/cm². Una intensidad de 25 mJ/cm² para ambos tiempos de incubación presenta un efecto proliferativo, aunque sin significancias estadísticas respecto al control, aumentando el 17 y el 13% respectivamente, respecto al control sin irradiación UVB. La viabilidad de los HDF no se ve afectada significativamente con exposiciones inferiores a 50 mJ/cm² ni a 24 ni a 48h posterior a la incubación. En este punto se presenta una viabilidad celular de alrededor de 83%. Para el caso de incubación post-irradiación, la intensidad de 100 mJ/cm² muestra una viabilidad moderada (>75%), a pesar de representar una diferencia estadística con respecto al control. Por lo tanto, se presenta como una irradiación aceptada y poco tóxica para los HDF. Intensidades superiores estimulan los procesos apoptóticos de los fibroblastos inducido por las caspasas-8 y -3, las cuales incrementan su expresión mediante el estímulo de la radiación UVB, y se ven altamente sobre-reguladas después de 12 h posterior a la irradiación⁴⁷. Es precisamente el efecto encontrado en la viabilidad de HDF, la cual se ve reducida no solo por incremento de la intensidad UVB sino por el tiempo de incubación post-irradiación.

3.2.2 Determinación del efecto fotoprotector de los extractos *R. officinalis*, *T. vulgaris* y hojas de *S. sonchifolius* sobre HDF sometidos a radiación UVB

La exposición crónica o aguda de la piel a la radiación UV induce envejecimiento prematuro, y afecta el fenotipo de diversas células, incluyendo queratinocitos, células dendríticas y fibroblastos, alterando la estructura o componentes de la matriz extra celular (ECM)¹¹⁶. Entre los componentes, tal como se ha informado previamente, se encuentra el colágeno, la elastina

y los glicosaminoglicanos (GAGs), cuyas principales funciones son mantener la fuerza, elasticidad e hidratación de la piel, respectivamente. La exposición excesiva a la radiación UV, principalmente la radiación UVB, induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS activan vías de transducción de señales intracelulares como proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) las cuales inducen los factores de transcripción NFκB y AP-1, quienes estimulan la transcripción de MMP-1, MMP-3 y MMP-9¹¹⁷ y la subsecuente degradación de los componentes de la ECM colágeno y elastina. Por otro lado, el factor de transcripción AP-1 también inhibe la síntesis de pro-colágeno, a partir del cual se forma el colágeno activo, al inhibir el efecto del factor de crecimiento transformante β (TGF-β) que consecuentemente reduce la transcripción de los genes colágeno tipo Ia1 (COL1A1) y COL3A1, quienes codifican los precursores del colágeno tipo I y tipo III respectivamente⁵⁰. Esto desencadena un incremento en la eliminación de colágeno y elastina y una disminución en su síntesis, afectando la fuerza y elasticidad de la piel y llevando a la aparición de arrugas. Por tanto, para determinar las propiedades fotoprotectoras y antienvjecimiento de extractos de *R. officinalis* (R4 y R6), *T. vulgaris* (T4 y T6) y hojas de *S. sonchifolius* (HY5 y Hy7), se evaluó el efecto sobre la producción de MMP-1 y ROS en HDF, inducida por la radiación UVB. Además, se determinó el efecto de los extractos en la producción de pro-colágeno, la cual es notablemente reducida por acción de la radiación UVB.

3.2.2.1 Efecto de la radiación UVB sobre la producción de MMP-1 en HDF

Con el fin de evaluar el efecto de los extractos sobre la producción de MMP-1 en HDF cuando son sometidos a irradiación UVB, se determinó inicialmente el efecto de la radiación UVB en HDF y su producción de MMP-1. Se evaluaron los sobrenadantes de los cultivos celulares sometidos a radiaciones UVB (25, 50, 100 y 200 mJ/cm²) después de periodos de incubación de 24, 48 y 72 h (Figura 11). La producción de MMP-1 a 24 h no presentó un efecto dosis-dependiente, pues no se encuentran valores significativos entre el control y las irradiaciones de 25 a 100 mJ/cm². Contrario a lo esperado a 200 mJ/cm², se disminuye cerca del 73% respecto al control sin estímulo UVB. En el caso de la producción de MMP's luego de 48 h de incubación, no se presentó una homogeneidad en los resultados, sin embargo se

encontró diferencias estadísticamente significativas a 100 mJ/cm², en donde se presentó un incremento significativo (52%). No obstante, éstas evidencias no son resultado de un comportamiento dosis-dependiente, caso contrario al observado para las mediciones de producción de MMP-1 a 72 h de incubación post-irradiación, en la cual se logró evidenciar efecto dosis dependiente con la irradiación suministrada a los HDF. Para un tiempo de incubación de 72 h post-irradiación se presentaron incrementos de 38, 86 y 120% en los niveles de MMP-1 respecto al control basal -sin radiación UVB, cuando las células son estimuladas con irradiaciones de 50, 100 y 200 mJ/cm². Por lo tanto, se considera que 72 h posteriores a una irradiación de 100 mJ/cm² son las condiciones óptimas para la medición en la producción de MMP-1 en HDF (Figura 11).

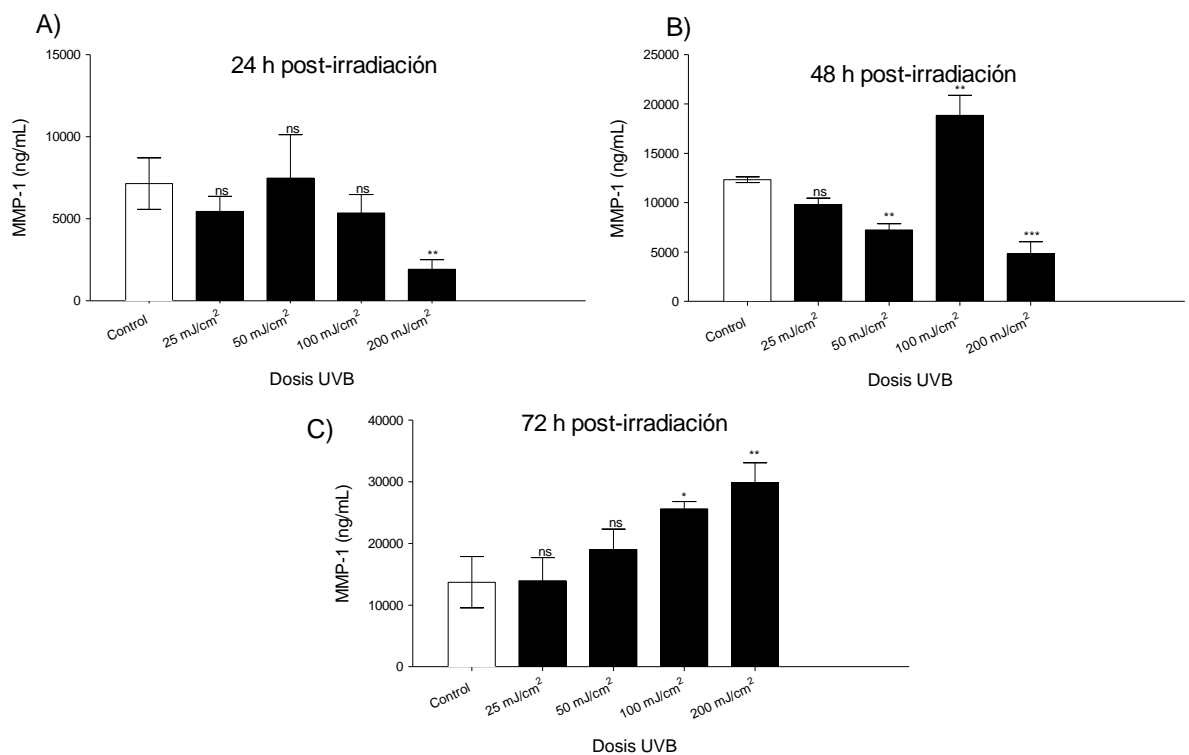


Figura 11. Efecto de la radiación UVB en la producción de MMP-1 en HDF. A) 24 h post-irradiación, B) 48 h post-irradiación, C) 72 h post irradiación. Para todos los tiempos se suministraron 25, 50, 100 y 200 mJ/cm². Los resultados se expresan como la media \pm S.D para tres experimentos triplicados independientes de un mismo ensayo. Todos los datos son mostrados como la media \pm S.D de tres replicas independientes del ensayo. P valor < 0.0001, * p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.0001, ^{ns} p >0.05 comparado con el respectivo control determinado por ANOVA one way y aplicando el posttest de Tukey.

3.2.2.2 Efecto de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* sobre la producción de MMP-1 en HDF estimulados con radiación UVB

La producción de MMP-1 fue evaluada en los sobrenadantes obtenidos del cultivo celular de HDF pre-tratados con extractos de *R. officinalis* (R4 y R6), *T. vulgaris* (T4 y T6) y *S. sonchifolius* (HY5 y HY7) durante 24 h, estimulados con UVB a 100 mJ/cm² e incubados durante 72 h a 37°C y 5% CO₂. Los resultados se presentan en la Figura 12 y se encuentran normalizados respecto a la viabilidad celular presentada en el ensayo.

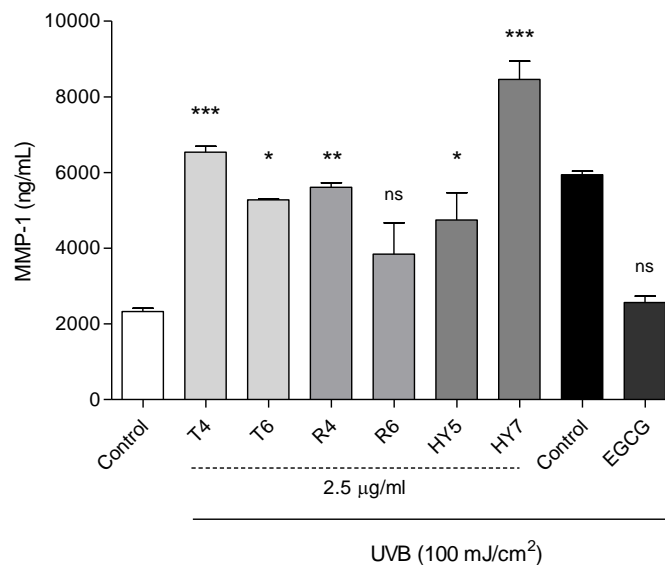


Figura 12. Efecto de los extractos sobre la producción de MMP-1 en HDF estimulados con UVB. Actividad supresora de R4, R6, T4, T6, HY5 y HY7 a 2.5 µg/mL usando EGCG a 25 µM y controles de células irradiadas y sin irradiar bajo las mismas condiciones experimentales de tiempo y cambio de medio en la producción de MMP-1 determinado por ELISA. Los resultados se expresan como la media ± S.D para tres experimentos triplicados independientes de un mismo ensayo. Todos los datos son mostrados como la media ± S.D de tres replicas independientes del ensayo. P valor < 0.0001, **p*<0.05, ***p*<0.005, ****p*<0.0001, ^{ns}*p*>0.05 comparado con el control sin radiación UVB determinado por ANOVA one way y aplicando el postest de Tukey.

La exposición a la radiación UVB incrementó 155% la producción de MMP-1 en HDF con respecto a HDF no irradiados. El pre-tratamiento de fibroblastos con los extractos de *R. officinalis* (R6) redujo en un 35% la producción de MMP-1 y no presentó diferencias estadísticamente significativas con el control de HDF sin estímulo UVB. Por otro lado, los

extractos de *S. sonchifolius* (HY5), *T. vulgaris* (T6) y *R. officinalis* (R4) lograron reducir en 20% ($p < 0.05$), 11% ($p < 0.05$) y 5.5% ($p < 0.005$) respectivamente, la producción de MMP-1 respecto al control de células irradiadas con 100 mJ/cm². Los extractos T4 y HY5 no disminuyeron la producción de MMP-1, por el contrario se presentan incrementos del 10% y 42% respecto al control de células irradiadas. Aunque se presentaron interesantes actividades supresoras de la producción de MMP-1 con el extracto de *R. officinalis* (R6), los efectos observados fueron menores al presentado por el compuesto de referencia EGEG, el cual es ampliamente utilizado en productos antienviejimiento. Previamente se ha demostrado que el efecto de EGEG en la disminución en la producción de MMP-1, se debe a la activación de los factores AP-1 y NF- κ B¹¹⁸, el cual logró disminuir alrededor del 56% la producción de MMP-1 respecto al control de células irradiadas, un valor muy cercano al de la MMP-1 en células no irradiadas. A pesar de las diferencias entre ambos resultados, ninguno de los dos presentó diferencias estadísticas con el control de células sin radiación UVB, lo que sugiere la potencialidad del uso del extracto R6 en la prevención de fotoenvejecimiento debido a la exposición UVB. Adicional a esto, existen varios reportes sobre los efectos fotoprotectores de *R. officinalis*^{2,26,28,42,119} entre los cuales se encuentran estudios del extracto acuoso y del ácido carnósico, que indican una inhibición en la expresión de MMP-1 inducida por radiación UVB. Algunos reportes indican que los extractos de *R. officinalis* son agentes fotoprotectores mediante su acción en las reacciones generadas por los ROS, sin embargo, no se puede sesgar el análisis únicamente a su alta actividad antioxidante. Es necesario realizar otro tipo de análisis y la evaluación de compuestos químicos aislados, para determinar el mecanismo de acción de su efecto fotoprotector.

3.2.2.3 Efecto de la radiación UVB sobre la producción de pro-colágeno tipo I α 1 en HDF

Con el objetivo de determinar el efecto que tiene la radiación UVB en la producción de pro-colágeno tipo I α 1, los HDF son sometidos a diferentes intensidades de irradiación UVB. Se determinó inicialmente el efecto de la radiación UVB en HDF y su producción de pro-colágeno usando el kit de ensayo pro-colágeno I α 1 Humano DuoSet Kit de ELISA (R&D systems.; USA). Se evaluaron los sobrenadantes de los cultivos celulares sometidos a radiaciones UVB (25, 50, 100 y 200 mJ/cm²) después de periodos de incubación de 24, 48 y

72 h (Figura 13). Se determinó que las condiciones óptimas para la evaluación en la producción de pro-colágeno usando UVB como estímulo inhibitor de ésta proteína son 100 mJ/cm² de intensidad UVB y 24 h de incubación post-irradiación, pues a éstas condiciones, los niveles de pro-colágeno disminuyen más del 40% con respecto a los niveles basales. Aunque la irradiación a 200 mJ/cm² a 24 horas post irradiación genera una disminución de cerca del 60% de pro-colágeno, ésta intensidad genera efectos negativos importantes en la viabilidad, disminuyéndola hasta cerca del 50% (Figura 10), por lo tanto, no es óptima para éste ensayo. Cabe notar que ninguno de los demás tiempos e intensidades de radiación presentó diferencias tan marcadas como las encontradas a 100 mJ/cm² y 24 h post-irradiación.

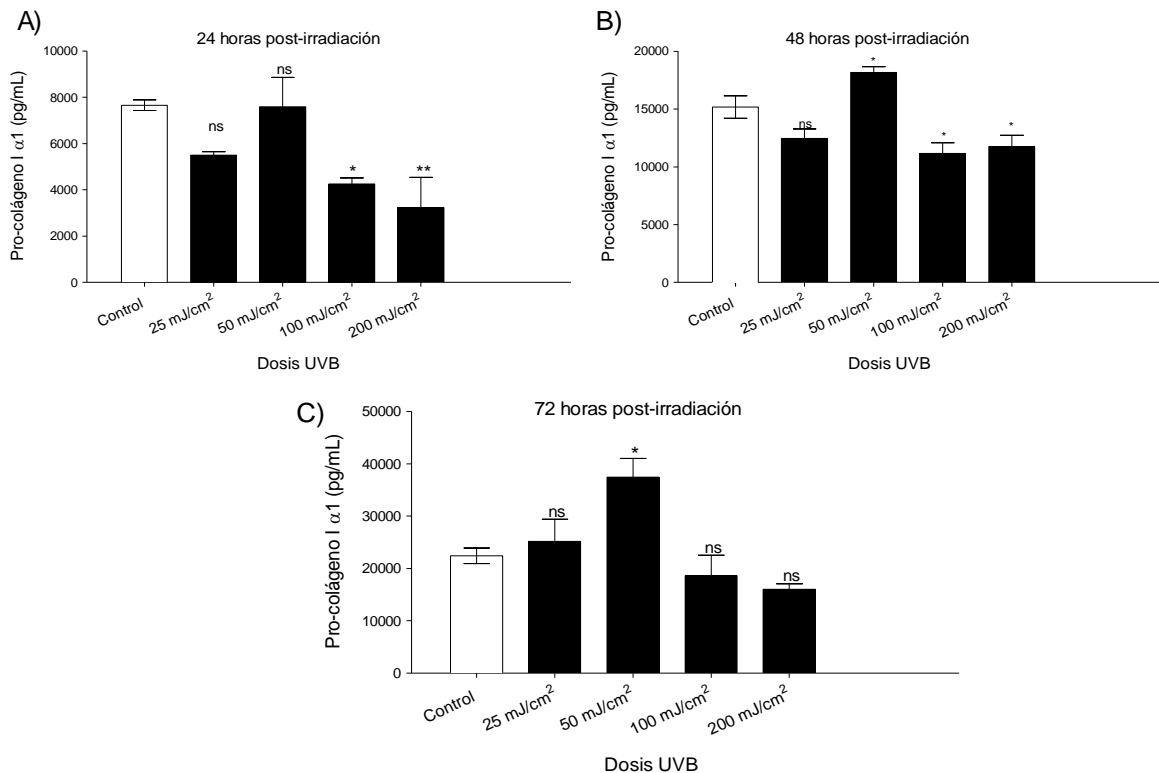


Figura 13. Efecto de la radiación UVB en la producción de pro-colágeno tipo I α1 en HDF. A) 24 h post-irradiación, B) 48 h post-irradiación, C) 72 h post irradiación. Para todos los tiempos se suministraron 25, 50, 100 y 200 mJ/cm². Los resultados se expresan como la media ± S.D para tres experimentos triplicados independientes de un mismo ensayo. Todos los datos son mostrados como la media ± S.D de tres replicas independientes del ensayo. P valor < 0.0001, **p*<0.05, ***p*<0.005, ****p*<0.0001, *ns**p*>0.05 comparado con el respectivo control HDF sin irradiar determinado por ANOVA one way y aplicando el postest de Tukey.

3.2.2.4 Efecto de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* sobre la producción de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ en HDF estimulados con radiación UVB

Durante el proceso de fotoenvejecimiento de la piel los precursores de colágeno I y III se encuentran significativamente reducidos en la dermis papilar, y su reducción correlaciona con la severidad clínica del fotoenvejecimiento⁹⁶. Esta reducción es resultado de la inhibición en la biosíntesis de pro-colágeno y el incremento de los MMP. El efecto de los MMP's en los fibroblastos estimulados con UVB ya fue evaluado en la sección anterior (3.2.2.2), no obstante, el objetivo de éste apartado es determinar el efecto de los extractos sobre la producción de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ en HDF estimulados con radiación UVB. Se evaluaron los extractos de *R. officinalis* (R4 y R6), *T. vulgaris* (T4 y T6) y *S. sonchifolius* (HY4 y HY6) a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bajo las condiciones determinadas anteriormente 100 mJ/cm^2 y 24 h de incubación post-irradiación (Figura 13). Los resultados se encuentran ilustrados en la Figura 14.

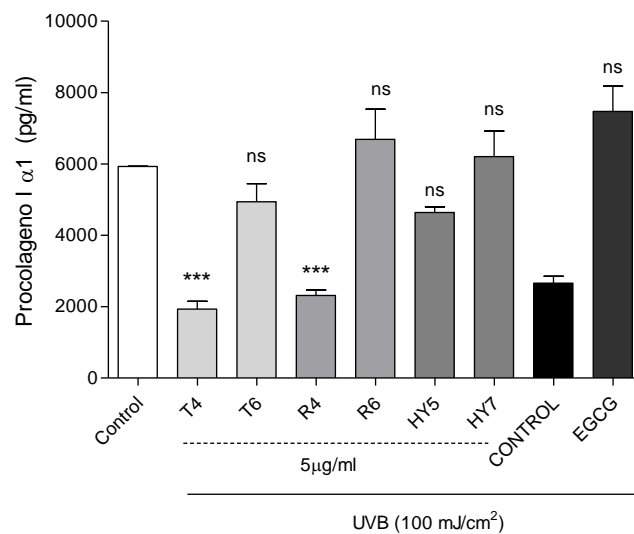


Figura 14. Efecto de los extractos sobre la producción de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ en HDF estimulados con UVB. Actividad de R4, R6, T4, T6, HY5 y HY7 inductora de pro-colágeno tipo I $\alpha 1$ a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ usando EGCG a 25 μM y controles de células irradiadas y sin irradiar bajo las mismas condiciones experimentales de tiempo y cambio de medio, determinado por ELISA. Los resultados se expresan como la media \pm S.D para tres experimentos triplicados independientes de un mismo ensayo Todos los datos son mostrados como la media \pm S.D de tres replicas independientes del ensayo. P valor < 0.0001 , * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$, ^{ns} $p > 0.05$ comparado con el control sin radiación UVB determinado por ANOVA one way y aplicando el posttest de Tukey.

La producción de pro-colágeno disminuye 55% en las células irradiadas (100 mJ/cm² UVB) respecto a las células sin irradiar cuando son sometidas a las mismas condiciones experimentales de cambio de medio y tiempos de incubación (24 h post irradiación, y 24 horas de pre-tratamiento pre-irradiación). El efecto de los extractos sobre la producción de pro-colágeno tipo I α 1 en HDF estimulados con UVB fue evaluado tras un proceso de pretratamiento de 24 h con los extractos. Los resultados en cuanto a la producción de pro-colágeno para los HDF tratados con los extractos T6, R6, HY5, HY7, HY7 y el control EGCG no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el control basal (sin radiación UVB), aunque fue el control EGCG el que incrementó en mayor medida la producción de pro-colágeno (20% más que el control basal y 180% respecto a los HDF irradiadas). Los extractos de *R. officinalis* R6 y *S. sonchifolius* (HY7) lograron incrementar en 150% y 133% la producción de ésta proteína respecto a los HDF irradiados, inclusive sobrepasan en 12% y 5% la producción de pro-colágeno basal. Esto puede ser sumamente beneficioso para evitar la fragmentación y pérdida de la estructura causada por la disminución de colágeno en la piel debido a la disminución en la síntesis de su precursor pro-colágeno. Si bien tal disminución es debida a efectos sinérgicos que se generan durante el envejecimiento, en mayor medida se da por la exposición a la radiación UV⁵. Los extractos de *T. vulgaris* (T6) y *S. sonchifolius* (HY5 y HY7), igualmente lograron incrementar los niveles de pro-colágeno en HDF en 86%, 74% y 133% respecto a las células irradiadas, niveles muy cercanos a los encontrados en el estado basal.

La disminución de los niveles de pro-colágeno en HDF inducida por radiación UVB es debida a diversos mecanismos, entre ellos se encuentran procesos apoptóticos de los fibroblastos lo que conlleva a una disminución de éstas células en la dermis, generando en igual proporción una disminución en la producción de pro-colágeno^{47,119}; y la inducción y sobre-expresión de la proteína activadora AP-1, la cual regula negativamente la transcripción de los genes (COL1A1 y COL2A2) que codifican para el pro-colágeno tipo I¹²⁰. Otro de los mecanismos envueltos en el proceso de inhibición de pro-colágeno es mediante mecanismos paracrinos, en los cuales se encuentra el factor TGF- β ¹²¹. Éste factor es la principal citoquina profibrótica encargada de estimular el crecimiento de los fibroblastos dérmicos, inducir la

secreción de colágeno y elastina a la ECM y de inhibir la expresión de algunas MMP's. La exposición a radiación UVB perjudica la vía de señalización generada por TGF- β mediante la reducción en la expresión de T β RII y el incremento de Smad7 alterando el paso inicial de la vía de señalización de TGF- β /Smad. Lo anterior conlleva a una regulación negativa de la síntesis de pro-colágeno contribuyendo a la disminución en los niveles de pro-colágeno en los fibroblastos dérmicos¹. En éste estudio no es posible hacer un acercamiento a los posibles mecanismos de acción de los extractos que han logrado incrementar de manera significativa los niveles de pro-colágeno en fibroblastos dérmicos. Para ello se es necesario recurrir a otras técnicas de transcripción genética que no son el enfoque de éste trabajo. Los extractos pueden estar actuando de manera sinérgica con uno o varios mecanismos o simplemente actuando como captadores de radicales evitando que todas las reacciones en cascada generada por los ROS inducidos por UVB se lleven a cabo. Por lo pronto, se pueden resaltar que los extractos de R6, HY5, T6 y HY7 pueden ser agentes beneficiosos para el cuidado de la piel y para el desarrollo de productos anti-envejecimiento debido a su capacidad de prevenir la degradación del pro-colágeno tipo I en HDF.

3.2.2.5 Efecto de la radiación UVB sobre la producción de ROS en HDF

El estrés oxidativo juega un rol esencial en la iniciación y propagación de los eventos de señalización que se genera en los fibroblastos como respuesta a la exposición a la radiación UV. Las radiación UV incrementa el peróxido de hidrogeno y otros ROS en la piel, pero además promueve la reducción de antioxidantes endógenos^{1,60}. Para determinar el efecto de la radiación UVB sobre la producción de ROS en HDF se evaluaron diferentes intensidades de radiación (20, 35, 50, 100 y 200 mJ/cm²) usando H₂O₂ como control positivo de oxidación, Quercetina a 250 μ M como agente captador de radicales y HDF sin irradiar para simular los niveles basales de ROS. Los resultados se presentan en la Figura 15, representados en términos del incremento de fluorescencia.

La producción de ROS en HDF incrementa de manera dosis dependiente con la intensidad de la irradiación aplicada expresada en términos de fluorescencia la cual es directamente proporcional a la cantidad de ROS intracelular. A pesar de no generar diferencias

estadísticamente significativas el control de H₂O₂, generó un incremento de 89% respecto al control basal muy similar al incremento de ROS generado por la irradiación a 20 mJ/cm² la cual tuvo un incremento de 5% respecto al control de oxidación (H₂O₂).

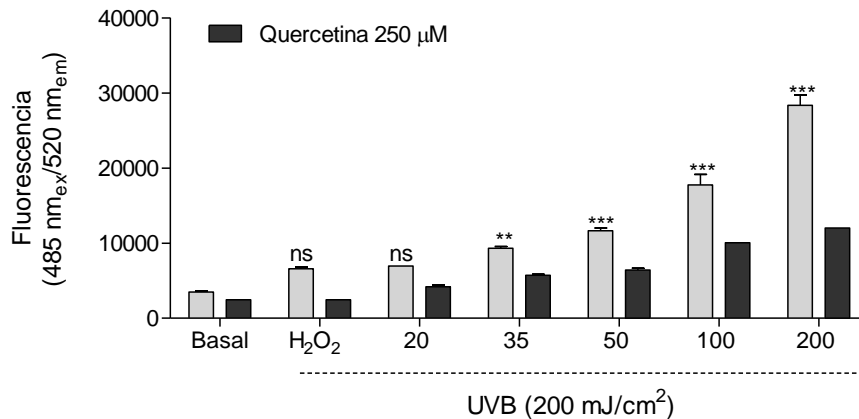


Figura 15. Efecto de la radiación UVB sobre la producción de ROS en HDF. Los HDF (5×10^4 células/pozo) fueron cultivadas en platos de 96 pozos durante 24 h. posteriormente las células fueron tratadas con DCF-DA (25 µM) durante 45 min a 37°C y 5% CO₂ e irradiadas con diferentes intensidades de radiación UVB, se usó H₂O₂ a 400µM como control positivo de oxidación en las células. La fluorescencia fue medida como indicador de producción de ROS intracelular. Los resultados se expresan como la media ± S.D para tres experimentos triplicados independientes de un mismo ensayo, todos los datos son mostrados como la media ± S.D de tres replicas independientes del ensayo. P valor < 0.0001, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$, ^{ns} $p > 0.05$ comparado con el control sin radiación UVB (basal) determinado por ANOVA one way y aplicando el posttest de Tukey.

En adelante la producción de ROS incrementa de manera exponencial, generando diferencias estadísticamente significativas y alcanzando un incremento máximo de 710% para la irradiación de 200 mJ/cm². En este punto es necesario aclarar que aunque en los estudios de los efectos de UVB sobre la viabilidad de HDF, la intensidad de 200 mJ/cm² generaba niveles de citotoxicidad de 28% y 49% a las 24 y 48 h de incubación post irradiación respectivamente, para la evaluación de la producción de ROS, el periodo de incubación post-irradiación fue de 1 h, periodo en el cual no se presentó toxicidad a las intensidades UVB evaluadas. En cuanto al control de Quercetina como captador de radicales, se pueden observar reducciones de hasta el 57% en la producción de ROS para la irradiación a 200 mJ/cm². En vista que el estímulo con 200 mJ/cm² de UVB en HDF genera los niveles más

altos de ROS sin afectar la viabilidad celular al tiempo de incubación establecido por el método, se determinó esa intensidad UVB para la evaluación del efecto de los extractos sobre la producción de ROS en HDF.

3.2.2.6 Efecto de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* sobre la producción de ROS inducido por UVB en HDF

Los extractos de *R. officinalis* R4, *T. vulgaris* T4 y *S. sonchifolius* HY5 fueron evaluados a diferentes concentraciones de 2.5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ y durante 24 h de pre-tratamiento con los HDF. El efecto sobre la producción de ROS se encuentra en la figura 16, usando como controles Quercetina y EGCG a 25 μM y células sin irradiar para el control basal.

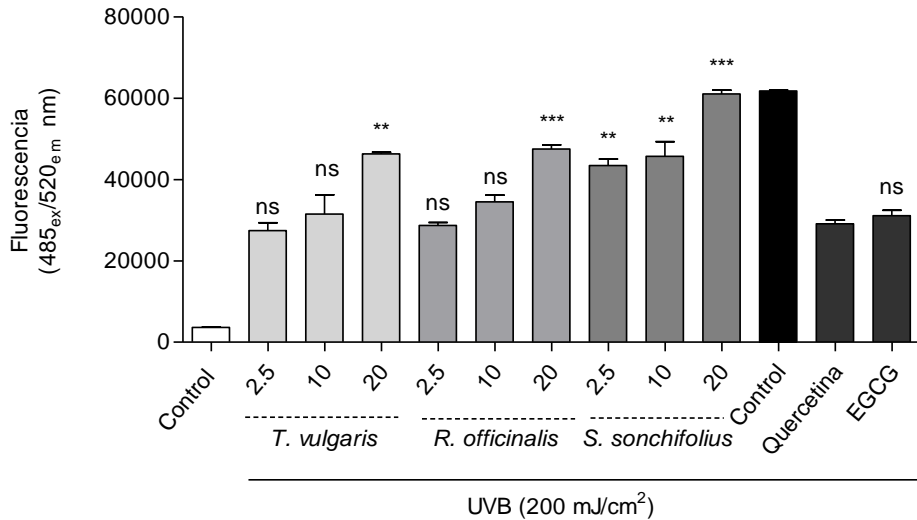


Figura 16. Efecto de los extractos R4, T4 y HY5 sobre la producción de ROS inducida por UVB en HDF. Los HDF (5×10^4 células/pozo) fueron cultivadas en platos de 96 pozos durante 24 h. posteriormente las células fueron tratadas con los extractos a concentraciones de 2.5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ y DCF-DA (25 μM) durante 45 min a 37°C y 5% CO_2 e irradiadas a 200 mJ/cm^2 , como control basal se usaron células sin irradiar ni pre tratadas con extractos, se usaron EGCG y Quercetina a 25 μM como controles. La fluorescencia fue medida como indicador de producción de ROS intracelular. Los resultados se expresan como la media \pm S.D para tres experimentos triplicados independientes de un mismo ensayo, todos los datos son mostrados como la media \pm S.D de tres replicas independientes del ensayo. P valor < 0.0001, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$, ^{ns} $p > 0.05$ comparado con el control de Quercetina determinado por ANOVA one way y aplicando el postest de Tukey.

Los extractos seleccionados para la determinación del efecto modulador sobre la producción de ROS en HDF inducida por radiación UVB fueron aquellos que *in-vitro* presentaron altos niveles de capacidad captadora de radicales, de esta manera R4, T4 y HY5 fueron usados a concentraciones que no presentaron toxicidad en los HDF a las condiciones experimentales. Los extractos de *T. vulgaris* y *R. officinalis* a concentraciones de 2.5 y 10 µg/mL disminuyeron significativamente la producción de ROS intracelular entre un 44% y 55% y no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de Quercetina que disminuyó la producción de ROS en 33% respecto al control de células irradiadas. El extracto de *S. sonchifolius* disminuyó en menor medida la producción de ROS, siendo la concentración de 2.5 µg/mL la que moduló en mayor medida las ROS con una disminución del 30% respecto a las células irradiadas. Se observa un efecto inverso respecto a la producción de ROS inducidos por UVB vs la concentración de extracto usada, lo cual indica que son las concentraciones más bajas de los extractos las que logra modular en mayor medida la producción de ROS. Posiblemente las concentraciones más altas comienzan a generar efectos tóxicos sobre las células aunque a las condiciones experimentales no se presenten efectos adversos en la viabilidad celular. Lo anterior soporta los ensayos iniciales sobre el efecto de los extractos en la viabilidad celular de los HDF en los cuales se demostró que concentraciones superiores a 10 µg/mL, afectan considerablemente la viabilidad celular (<50%). Según los resultados obtenidos en éste estudio, es posible que las concentraciones más altas de los extractos incrementan de manera considerable la producción de ROS, dando como resultado procesos apoptóticos; por lo tanto la formación concomitante de ROS en HDF expuestos a altas concentraciones de extracto y radiación UVB, puede ser responsable del efecto observado con el incremento de la concentración en cuanto a la producción de ROS en HDF.

En las teorías de las causas del envejecimiento, las ROS se considera que constituyen uno de los principales factores que contribuyen a los cambios fisiológicos que se observan durante el envejecimiento. Sin embargo, las ROS juegan un papel más crucial en el proceso de fotoenvejecimiento. Posterior a la radiación UV, las ROS comienzan a liberar citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, específicamente la proteína activadora AP-1 y el

factor nuclear NF- κ B los cuales regulan positivamente MMP's como MMP-1,-3,-8 y -9 generando por defecto la degradación de las proteínas que componen la estructura funcional de la ECM. De hecho, MMP-1 está asociado con la delección de DNA mitocondrial, reforzando la posibilidad que ROS se encuentran altamente relacionados en esta vía. Además, se ha demostrado que las ROS decrecen la expresión el factor de crecimiento transformante TGF- β el cual es el encargado de comenzar la cascada de señalización encargada de estimular la síntesis de pro-colágeno tipo I. Por lo tanto, una regulación negativa de TGF- β conlleva a una disminución en la síntesis de pro-colágeno y a una disminución de colágeno en la ECM.

En resumen, se evaluaron diversos mecanismos enfocados en la fotoprotección de los componentes de la ECM, especialmente el colágeno, para ello se evaluaron extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*. Todos los extractos expresaron potenciales propiedades fotoprotectoras mediante la disminución de MMP-1 (T6, R6 y HY5), incremento en la producción de pro-colágeno (T6, R6, HY5 y HY7) y disminución de ROS inducidas por radiación UVB (T4 y R4). Sin embargo, los extractos de *R. officinalis* presentaron las mejores propiedades fotoprotectoras, logró disminuir de manera considerable la producción de MMP-1 en HDF estimulados con radiación UVB, llegando a niveles sin significancia estadística con el control basal. Además, en HDF estimulados con radiación UVB, el extracto R6 es capaz de mantener los niveles de pro colágeno, inclusive incrementando en un 12% la producción de pro-colágeno con respecto al estado basal. Finalmente, bajas concentraciones de extracto *R. officinalis* logran modular las ROS inducidas durante la exposición a la radiación UVB protegiendo los HDF de los efectos nocivos generados por las ROS. Aunque no es posible determinar exactamente el mecanismo por el cual el extracto logra proteger los HDF de la radiación UVB, con las evidencias obtenidas en éste estudio es posible decir que los extractos de *R. officinalis* logran inhibir en gran medida la secuencia de reacciones generadas por los ROS inducidos por radiación UVB, disminuyendo la producción de MMP-1 y estimulando la síntesis de pro-colágeno tipo I α 1. Con las anteriores evidencias se pueden postular los extractos de *T. vulgaris*, *S. sonchifolius* y en especial de *R. officinalis* (tanto extractos individuales como mezclas de ellos debido a efectos sinérgicos) como potenciales

ingredientes naturales fotoprotectores con propiedades antienvjecimiento, mediante el cuidado de los componentes de la matriz-extracelular. Además, éstas especies se encuentran aprobadas en el CosIng¹²² como ingredientes naturales como acondicionadores de la piel. No obstante, se requieren estudios adicionales especialmente de caracterización química, y pruebas *in-vivo* que demuestren la eficacia y seguridad de los extractos como ingredientes en formulaciones cosméticas. En este sentido, el propósito del siguiente capítulo versa sobre la caracterización química de los extractos evaluados, y en la determinación de los posibles metabolitos responsables de la bioactividad observada.

4 CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA E IDENTIFICACIÓN TENTATIVA DE METABOLITOS BIOACTIVOS FOTOPROTECTORES

El análisis de los metabolitos secundarios, especialmente aquellos que se encuentran en matrices biológicas complejas, es de gran importancia dentro del campo de las ciencias biológicas. Uno de los principales objetivos del estudio de metabolitos en muestras complejas es el descubrimiento de compuestos bioactivos. Sin embargo, las técnicas convencionales para la identificación y aislamiento de estos compuestos se basan en fraccionamientos biodirigidos, los cuales requieren gran cantidad de material vegetal, demandan una gran cantidad de tiempo y materiales para su aislamiento; y se corre el riesgo de obtener moléculas poco activas por posible degradación de la muestra o inclusive por efectos sinérgicos que pueden estar ocurriendo en el extracto o fracción¹²³.

El fingerprint cromatográfico es una técnica analítica que cobra cada vez más fuerza en el campo de los productos naturales, ya que proporciona la evaluación multi-componente de extractos vegetales. Además, el fingerprint permite realizar de manera rápida la clasificación de muestras complejas, con actividades biológicas que presentan dichas muestras. Así, el propósito de éste método no se basa en la identificación de cada metabolito de manera individual, sino comparar patrones del fingerprint cromatográfico y estos como afectan un sistema biológico dado, permitiendo la generación de hipótesis sobre señales que se encuentren relacionadas con determinada actividad biológica¹²⁴. El uso de herramientas estadísticas como análisis de correlación y loadings obtenidos de modelos de análisis multivariado ayudan a encontrar nuevos ingredientes bioactivos basados en sus características cromatográficas sin necesidad de generar un identificación exhaustiva¹²³, permitiendo la modelación y el desarrollo de métodos integrados rápidos y sencillos para la identificación de posibles marcadores de actividad.

El objetivo de éste capítulo es hacer uso de herramientas analíticas como el desarrollo de fingerprints mediante HPLC-DAD-MS, estándares de referencia seleccionados con base en

reportes de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* y herramientas estadísticas de comparación, discriminación y similitud de muestras, con el fin de sugerir los metabolitos responsables de las actividades antioxidantes (ORAC, FRAP) y anti-envejecimiento (anti-colagenasa, anti-elastasa, anti-hialuronidasa) presentes en los extractos de las especies bioactivas (capítulo II).

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Material vegetal y elaboración de extractos

El tratamiento del material vegetal, su obtención desinfección, almacenamiento y la elaboración de los extractos se encuentra descrito en la sección 2.1.1. Para el análisis cromatográfico se emplearon 7 extractos de diferente polaridad de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*, para un total de 21 extractos.

4.1.2 Material de referencia empleado

Se seleccionaron 13 estándares de referencia. Ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido rosmarínico, hesperidina, luteolina, apigenina, timol, scutellarina, ácido carnósico y carnosol. Los estándares fueron preparados a 1000 y 500 ppm dependiendo de la cantidad disponible para cada uno. Partiendo de esta solución, se prepararon 400 μ L a 50 ppm diluidos en ácido acético 0.1% y metanol grado HPLC en una proporción 50:50 tanto individualmente como en mezcla. Las soluciones stock de 500 y 1000 ppm fueron almacenadas en viales ámbar a -20°C . El análisis cromatográfico se realizó con las soluciones de 50 ppm frescas.

4.1.3 Preparación de muestras

Las soluciones stock preparadas a 30 mg/mL (2.1.2) son sonicadas durante 15 minutos a 30°C . Luego las muestras son centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos para finalmente preparar 400 μ L de las soluciones a 1000 ppm diluidas en ácido acético 0.1 y metanol en una proporción 50:50.

4.1.4 Análisis cromatográfico de los extractos mediante HPLC-DAD-MS

El análisis cromatográfico mediante HPLC, se llevó a cabo en un equipo Agilent series 1200 (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado con un desgasificador de vacío, un automuestreador automático, una bomba cuaternaria y un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación de los compuestos se realizó usando una columna Zorbax SB RRTT (alta resolución y alto rendimiento), con un flujo de 1.0 mL/min y a una temperatura del horno de la columna a 35°C. La fase móvil de la metodología optimizada, consistió en agua acidificada con ácido acético al 0.1% (A) y acetonitrilo (B), el gradiente lineal utilizado fue el siguiente: 0 min, 5% B; 1 min, 5% B; 2 min, 10% B; 11 min, 25% B; 13 min, 31% B; 15 min, 37% B; 30 min, 59% B; 35 min, 85% B; 38 min, 5% B. El volumen de inyección fue de 5 µL tanto para los estándares como para los extractos. Los compuestos analizados fueron monitoreados en el DAD a 254, 280, 320 y 360 nm y los espectros UV se registraron en un rango entre 200 y 400 nm.

Con el objetivo de generar una confirmación de la presencia de los compuestos utilizados como estándares en los extractos evaluados, se desarrolló un método mediante LC-MS, en un equipo Agilent 1200 LC-DAD-MSD-Q (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y una detección simultánea mediante DAD. La ionización para los estándares y los extractos se optimizó mediante un análisis por inyección de flujo (FIA). Las condiciones de ionización para las muestras y estándares se llevaron a cabo empleando la fuente ESI y las siguientes condiciones para el detector de masas: 60 psig; temperatura del gas de secado (N₂) 350°C, temperatura del vaporizador 400°C; voltaje del capilar 2.7 kV, Voltaje del fragmentor modo scan: 120 V; Voltaje del fragmentor modo SIM: 60-180V.

4.1.5 Análisis multivariado de datos e identificación tentativa de potenciales metabolitos responsables de las actividades biológicas evaluadas

Para el análisis multivariado se tabularon los resultados obtenidos en HPLC-DAD a las 4 longitudes de onda evaluadas. Posibles contaminantes y ruido de la señal se eliminaron con la exclusión de áreas inferiores a 5 mAU y altura de rechazo de picos cuando eran inferior a

1 mAU. Para este estudio, fueron aplicados los métodos de análisis de componentes principales y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales. El coeficiente de correlación de Pearson fue usada para soportar los análisis anteriores. Adicionalmente, se empleó un modelo de regresión por correlación de mínimos cuadrados parciales (PLS) y un análisis por correlación de compuestos con la bioactividad, con el fin de establecer un análisis de clasificación a partir de los cromatogramas obtenidos para los extractos, y establecer posibles correlaciones existentes entre las señales cromatográficas con las diferentes propiedades antienvjecimiento.

Los análisis de componentes principales (PCA), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) y análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA) fueron realizados en el software para análisis estadístico R, versión 3.1.2, usando los paquetes “muma”, mientras que los análisis de correlación fueron realizados usando Statghapics Centurion XV. Los datos fueron normalizados para ajustar diferencias entre las muestras además de transformaciones logarítmicas, escalamiento tipo Pareto y auto escalado.

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.2.1 Caracterización de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonhifolius* mediante HPLC-DAD-MS

Los extractos de plantas suelen estar constituidos de cientos de compuestos con una amplia diversidad química. Aunque muchos de ellos pueden estar en muy bajas concentraciones, pueden ser compuestos importantes en cuanto a su actividad, pues entre ellos se presentan efectos sinérgicos o antagonistas, y por tanto, se vuelven clave en la caracterización de los extractos vegetales¹²⁵. Por ello, el desarrollo de fingerprint para la caracterización de metabolitos en extractos vegetales ofrece una ayuda invaluable, además de proveer una rápida clasificación de las muestras¹²⁶. Aunque el principal objetivo es comparar muestras mediante los perfiles obtenidos en la técnica analítica, mediante el uso de estándares de referencia y detectores como el DAD y MS, es posible además determinar la presencia de muchos compuestos en los extractos vegetales.

Con el fin de evaluar la composición de los extractos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha sido la metodología analítica elegida para la evaluación de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*, por su facilidad de operación y sensibilidad, además de representar una de las metodologías más usadas para la caracterización de extractos vegetales^{123,125}. La caracterización química fue realizada mediante HPLC-DAD-MS, la cual es una técnica adecuada para la detección de compuestos de diversa naturaleza (Tabla 2)^{127,128}. Esta caracterización se llevó a cabo usando una columna sub 2 micras, permitiendo ajustar el método cromatográfico convencional a un método más rápido y con mayor resolución¹²⁵. En este estudio, se realizó la caracterización química de los siete extractos de cada especie con solventes de diferente polaridad, basados en el valor de la constante dieléctrica (Hexano, Acetato de etilo, acetona, acetona agua 75:25%, acetona agua 50-50%, acetona agua 25:75% y agua) (2.1.2). Esta diferencia de polaridad afecta directamente el tipo de compuestos a ser extraídos^{128,129} y como consecuencia, se afecta además la actividad de cada uno de los extractos, como se pudo observar en los resultados de actividad biológica (Tabla 3 y 4). Una batería de estándares fue seleccionada para determinar su presencia o no en los extractos vegetales. Se usaron los estándares ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido rosmarínico, hesperidina, luteolina, timol, scutellareina, ácido carnósico y carnosol (Figura 17).

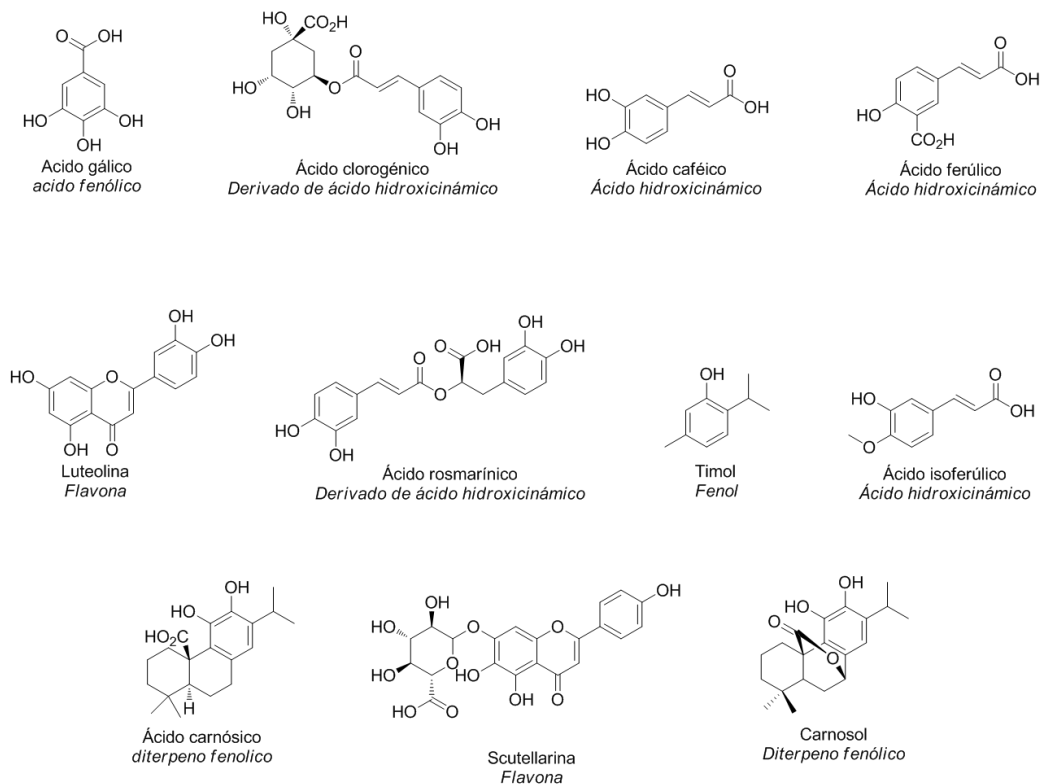


Figura 17. Estructuras de estándares usados para la detección en extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*.

Los 21 extractos fueron evaluados bajo las mismas condiciones cromatográficas, las cuales fueron optimizadas mediante un proceso sistemático utilizando los estándares de referencia mencionados y los extractos de las especies. La mezcla de estándares fue analizada usando las condiciones cromatográficas ya descritas. Así, se desarrolló un método no isocrático con un tiempo total de 38 min. En general se logró una buena separación entre los 11 analitos cumpliendo con los parámetros cromatográficos de resolución (>2), selectividad (>1) y factor de retención (k) entre 1 y 10 para 9 de los 11 analitos. Las últimas dos señales se presentan valores k superiores a 10, sin embargo esto no representa una desventaja en cuanto al desarrollo del método analítico debido a la complejidad que representan los extractos naturales, y por tanto diferencias tan grandes entre uno y otro metabolito permitirán una mayor separación en las muestras a evaluar. En la figura 18 se presenta un cromatograma

representativo del método analítico desarrollado, tanto para los extractos como para el mix de estándares y el gradiente de elución utilizado.

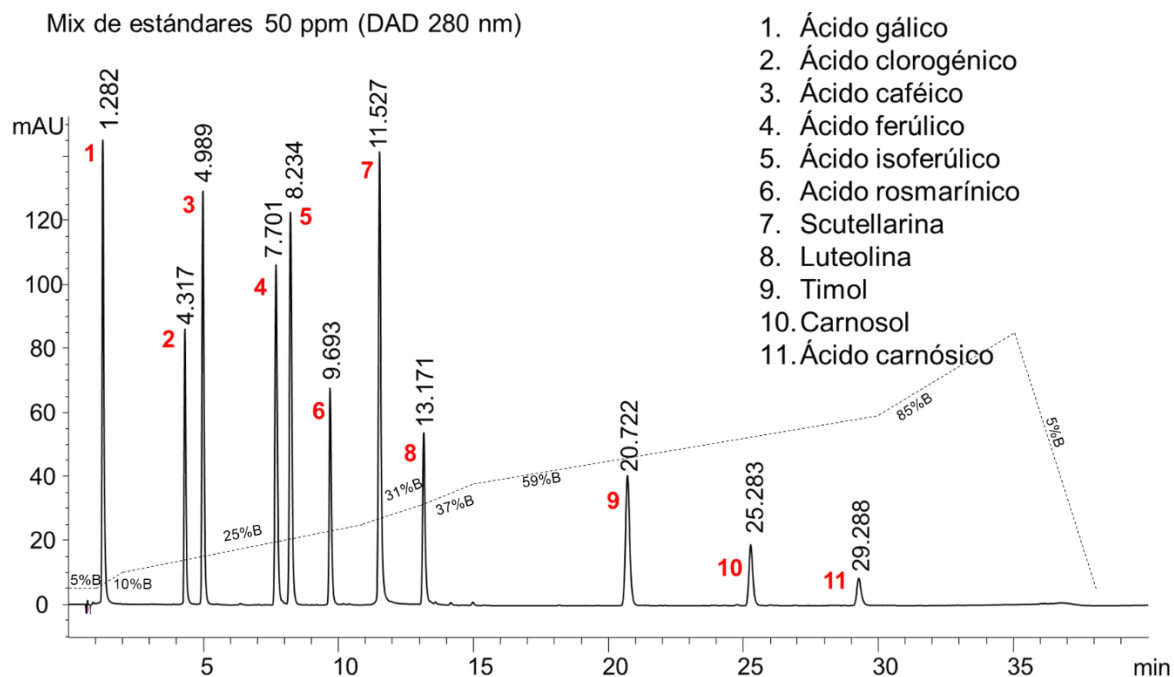


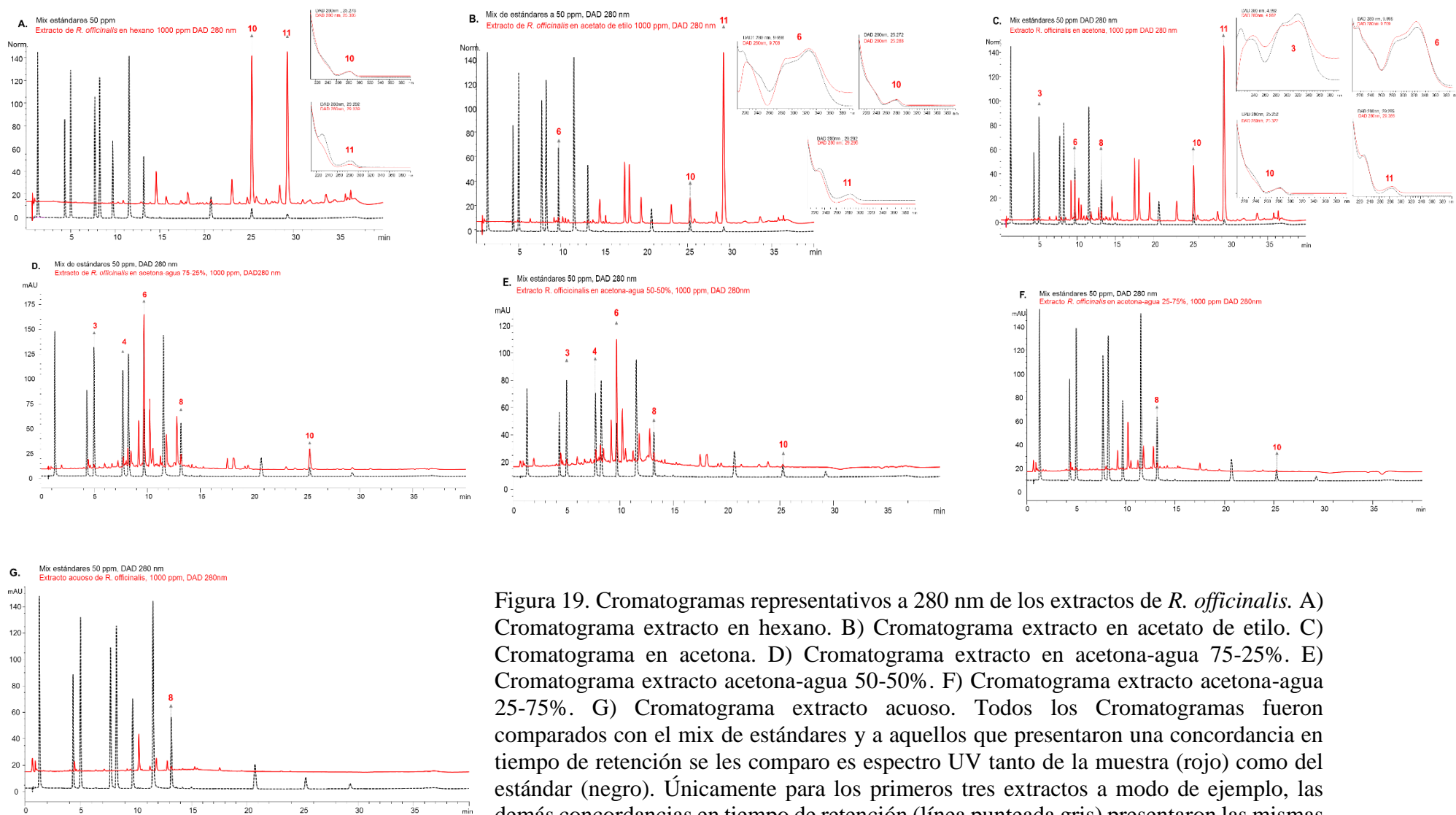
Figura 18. Cromatograma mix de estándares 50 ppm a 280 nm. En orden de elución: 1. Ácido gálico; 2. Ácido clorogénico; 3. Ácido cafeíco; 4. Ácido ferúlico; 5. Ácido isoferúlico; 6. Ácido rosmarínico; 7. Scutellarina; 8. Luteolina; 9. Timol; 10. Carnosol; 11. Ácido carnósico. En línea punteada se representa el gradiente de elución en porcentaje del solvente B.

4.2.1.1 Fingerprint *Rosmarinus officinalis*

Los cromatogramas fingerprint para los siete extractos de *R. officinalis* son representados en la figura 19. En ésta se presentan los fingerprint a una longitud de onda de 280 nm y cada uno es comparado con el mix de estándares igualmente a 280 nm. Para los metabolitos en los cuales se presenta la correspondencia en cuanto a tiempo de retención con alguno de los estándares del mix, se presentan los espectros UV (siempre y cuando las condiciones de concentración en la muestra lo permitiesen). Con el cambio en la polaridad del solvente de extracción, fue posible detectar el cambio en la diversidad química. En este sentido, es

evidente que extracciones con solventes de carácter apolar generan una menor diversidad química con tan solo 11 señales detectables. La diversidad química va incrementando conforme se incrementa la polaridad, obteniendo la mayor cantidad de señales detectables en el extracto acetona-agua 75-25% con 48 señales. Nuevamente se presenta una disminución en la cantidad de señales detectadas en los extractos de mayor polaridad, con 13 señales en el extracto acuoso, por ejemplo, usando DAD 280 nm, longitud de onda en la cual fue posible observar mayor cantidad de señales para los extractos de *R. officinalis*.

Para cada uno de los extractos se realizó un análisis comparativo en cuanto al tiempo de retención y espectros UV obtenidos en la señal cromatográfica, con el fin de determinar la posible presencia de los estándares referenciados en las muestras evaluadas. Se determinó así la posible presencia de carnosol (10) y ácido carnósico (11) en el extracto de hexano, presentándose como las señales de mayor abundancia relativa en el extracto. La señal que posiblemente corresponde al analito 11 permanece con una abundancia relativa superior a las demás señales hasta el extracto acetónico, mientras que 10, aunque disminuye su abundancia relativa respecto a las demás señales, sigue presente hasta el extracto acetona-agua 25-75%. En los extractos acetato de etilo, acetona-agua 50-50% y en aquellos de polaridad intermedia, se presenta una señal en el tiempo de retención 9.7 que corresponde al ácido rosmarínico, no solo por el tiempo de retención, sino con el espectro UV como se observa en la figura 19 B. y C. El extracto de acetona presenta una gran cantidad de señales mayor que el extracto de acetato de etilo y en menores tiempos de retención, lo que puede ser adjudicado a una mayor presencia de compuestos tipo polifenoles¹²⁸.



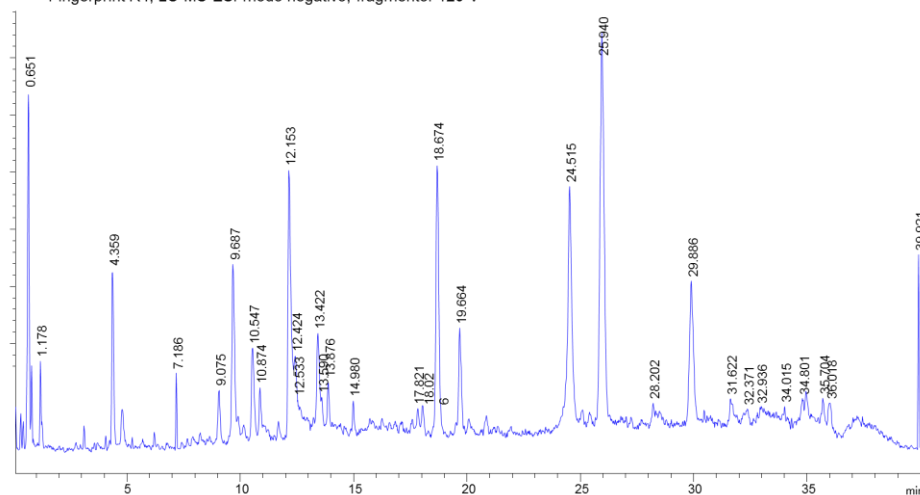
características en UV.

Figura 19. Cromatogramas representativos a 280 nm de los extractos de *R. officinalis*. A) Cromatograma extracto en hexano. B) Cromatograma extracto en acetato de etilo. C) Cromatograma en acetona. D) Cromatograma extracto en acetona-agua 75-25%. E) Cromatograma extracto acetona-agua 50-50%. F) Cromatograma extracto acetona-agua 25-75%. G) Cromatograma extracto acuoso. Todos los Cromatogramas fueron comparados con el mix de estándares y a aquellos que presentaron una concordancia en tiempo de retención se les comparo es espectro UV tanto de la muestra (rojo) como del estándar (negro). Únicamente para los primeros tres extractos a modo de ejemplo, las demás concordancias en tiempo de retención (línea punteada gris) presentaron las mismas

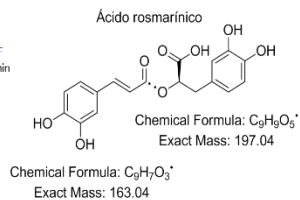
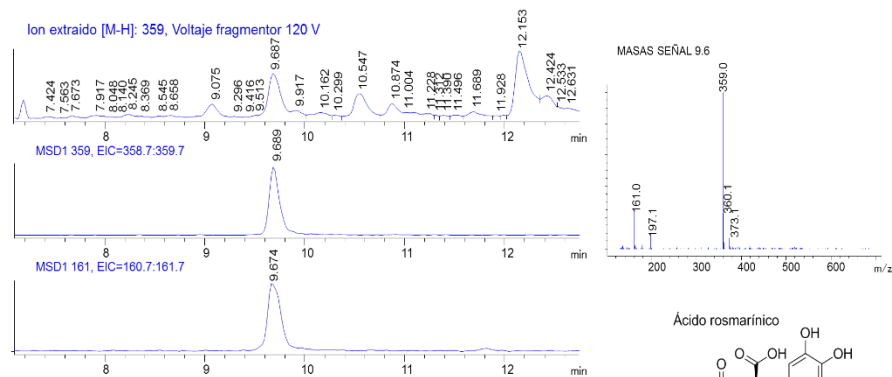
En el extracto de acetona se encuentran señales en 4,9; 9,7; 13,2; 25,3 y 29,3 los cuales corresponden tanto en tiempo de retención como en puntos de máxima absorción con los estándares ácido clorogénico, ácido rosmarínico, luteolina, carnosol y ácido carnósico. En los extractos de *R. officinalis* realizados con solventes de mezclas acetona-agua se presenta una mayor cantidad de compuestos de carácter polifenólico, y se puede corroborar con la evaluación del contenido de polifenoles totales (Tabla 3 y figura 7). La diversidad química en estos extractos es mayor y la señal 6 se presenta en mayor abundancia con respecto a las demás señales de los fingerprint. Finalmente en los extractos de mayor carácter polar (acetona-agua 25-75% y agua) se presentó una notable disminución en cuanto al número de señales, para ambos extractos se presenta una señal correspondiente al tiempo 13,2 la cual corresponde en tiempo y en máximos de absorción del espectro UV a la flavona luteolina.

El ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico son metabolitos que se encuentran altamente relacionados con la biosíntesis de la planta y pueden considerarse como marcadores de actividad en *R. officinalis*. Lo anterior basado en la gran cantidad de reportes sobre la actividad de estos metabolitos y su responsabilidad en cuanto a la actividad que presentan los extractos de esta planta^{20,21,26,28,68,86,108,128,130}. En procura de obtener un resultado más contundente respecto a los posibles constituyentes de *R. officinalis*, se decidió realizar una identificación tentativa de los constituyentes del extracto que presentó mayor diversidad química, siendo éste el realizado con acetona-agua 75-25% (R4) –bajo las condiciones cromatográficas determinadas inicialmente-. Partiendo del análisis de fingerprint en LC-MS (figura 20), se realizó la técnica de ion extraído con el fin de determinar la presencia de los estándares. Se logró determinar la presencia probable de ácido rosmarínico, scutellarina, carnosol y ácido carnósico. Sin embargo, otros metabolitos que habían sido señalados como posibles constituyentes de la matriz de romero, tales como ácido cafeico, ácido ferúlico y luteolina, no se les fue detectado el ion molecular, quizás debido a las condiciones de detección son muy débiles para obtener una fragmentación adecuada (2700V capilar, 120V fragmentor)¹³¹.

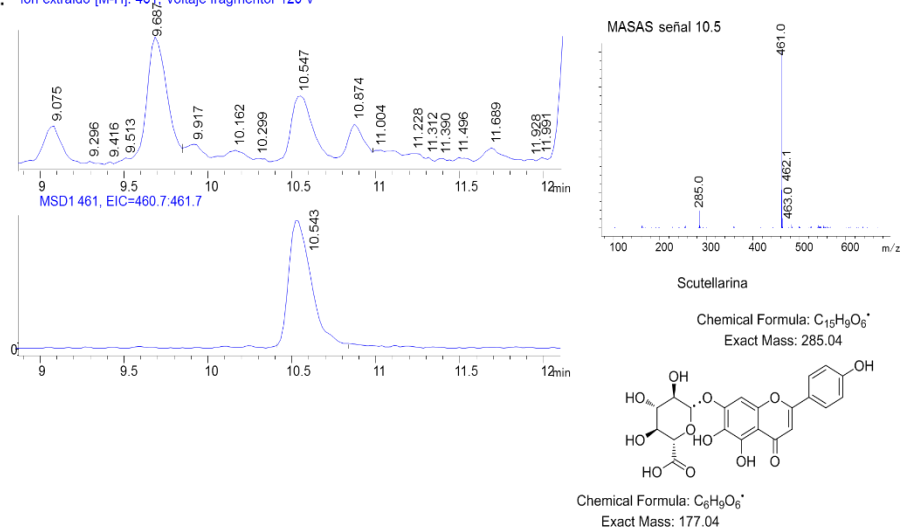
A. Fingerprint R4, LC-MS ESI modo negativo, fragmentor 120 V



B. Ion extraído [M-H]⁻: 359, Voltaje fragmentor 120 V



C. Ion extraído [M-H]⁻: 461, Voltaje fragmentor 120 V



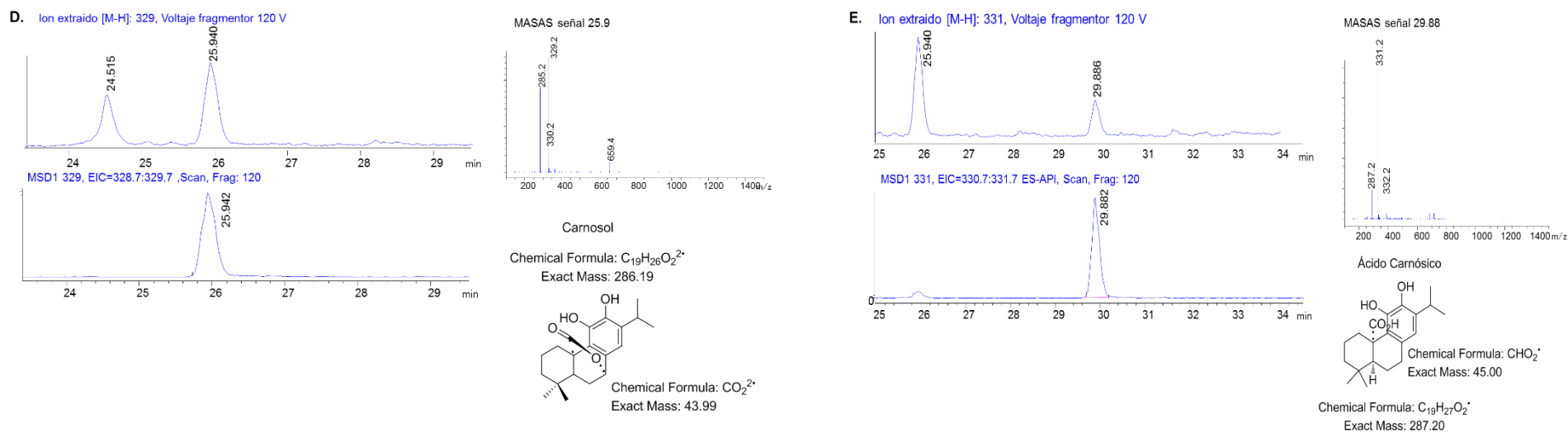


Figura 20. Cromatogramas mediante LC-MS de R4, condiciones para el detector voltaje capilar 2700 V voltaje del fragmentor 120 V, los espectros de masas fueron obtenidos en un rango de 200 a 1400. A) fingerprint extracto R4 ESI modo negativo scan. B) Zona del cromatograma 7-13 min, ion extraído M-H 359 presente en 9.69 min, se presenta el ion 161 presente en la fragmentación de ácido rosmarínico, a la derecha se presenta el espectro de masas obtenido para la señal a 9.69 min y en la parte inferior la respectiva fragmentación del ácido rosmarínico. C) zona del cromatograma de 9 a 12 min, ion extraído M-H 461 encontrado en el tiempo 10.5 min, a la derecha se encuentra el espectro de masas para la señal en 10.5 min y abajo la respectiva fragmentación para scutellarina. D) Ion extraído M-H 329, encontrado en el tiempo 25.9 min, a la derecha se presenta el espectro de masas para esta señal y en la parte inferior la respectiva fragmentación para el carnosol. E) Ion extraído para M-H 331 encontrado en 29.88 min, en la parte derecha espectro de masas para la señal en 29.88 min y la respectiva fragmentación del ácido carnósico.

Se realizó un análisis de ion extraído para otros compuestos reportados en muestras de *R. officinalis*¹³², en el cual se lograron detectar otros 4 compuestos presentes en R4. En la figura 21 se presentan los compuestos que mediante ion extraído pueden estar presentes y que corresponden a rosmanol, epirosmanol, isorosmanol y rosmadial.

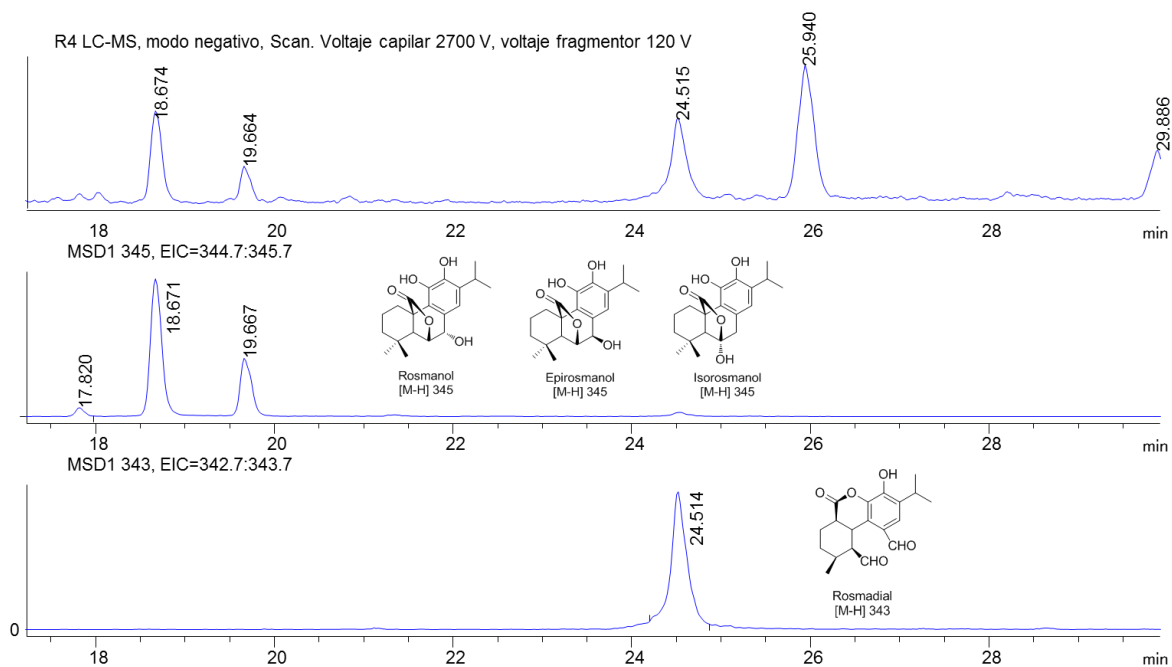


Figura 21. Ion extraído en R4 del M-H de compuestos que se reportan en extractos de *R. officinalis*, [M-H] 345: rosmanol, epirosmanol, isorosmanol; [M-H] 343: rosmadial.

4.2.1.2 Fingerprint *Thymus vulgaris*

Los extractos de *T. vulgaris* fueron analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas para *R. officinalis*. En la gráfica 22 se presentan los siete extractos representativos (280 nm) de *T. vulgaris* evaluados mediante HPLC-DAD superpuestos con el cromatograma para el mix de estándares. A cada una de las coincidencias en cuanto a tiempo de retención entre el mix de estándares y el extracto analizado se muestra la comparación del espectro UV.

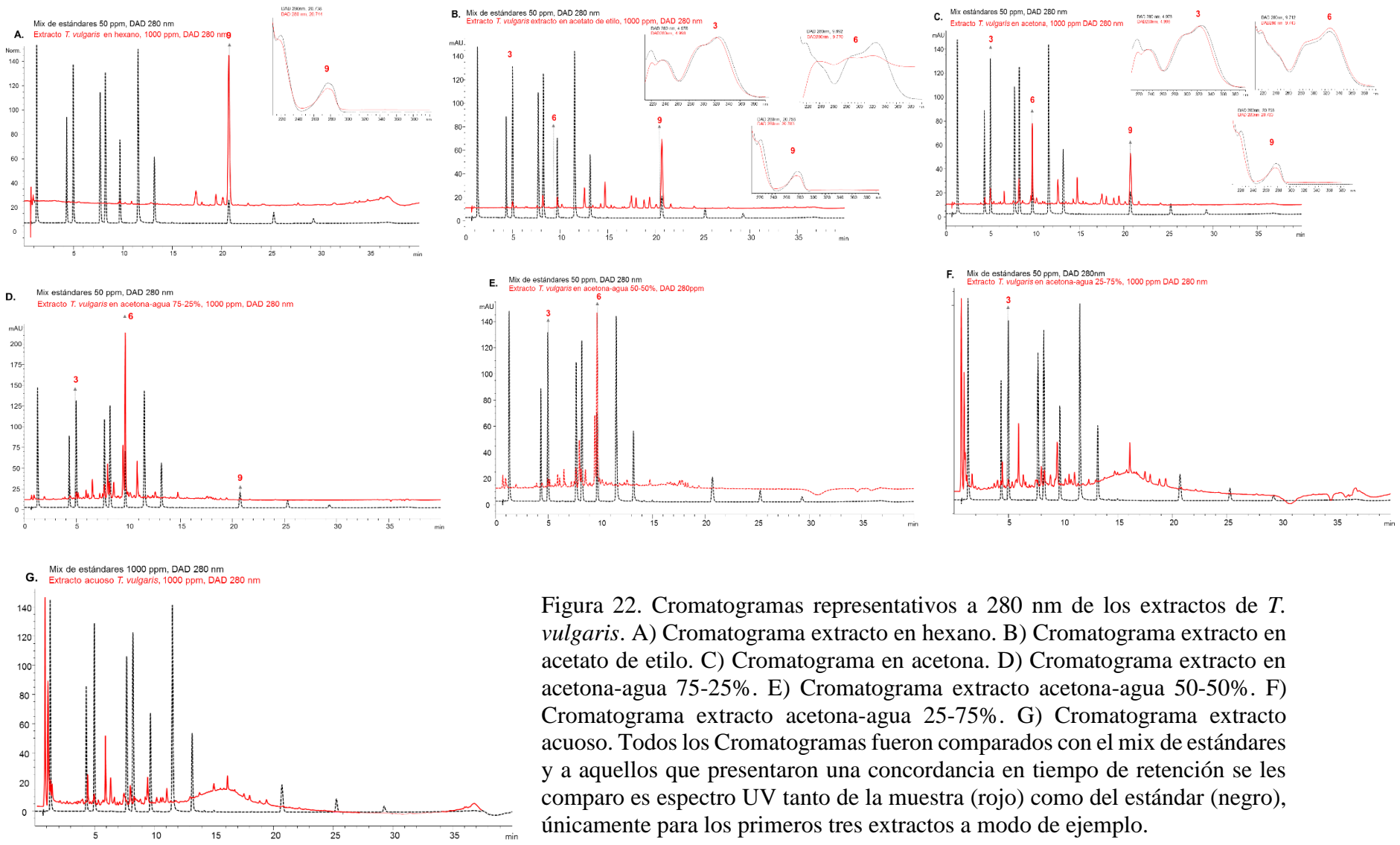


Figura 22. Cromatogramas representativos a 280 nm de los extractos de *T. vulgaris*. A) Cromatograma extracto en hexano. B) Cromatograma extracto en acetato de etilo. C) Cromatograma en acetona. D) Cromatograma extracto en acetona-agua 75-25%. E) Cromatograma extracto acetona-agua 50-50%. F) Cromatograma extracto acetona-agua 25-75%. G) Cromatograma extracto acuoso. Todos los Cromatogramas fueron comparados con el mix de estándares y a aquellos que presentaron una concordancia en tiempo de retención se les comparo es espectro UV tanto de la muestra (rojo) como del estándar (negro), únicamente para los primeros tres extractos a modo de ejemplo.

En cuanto a la diversidad química obtenida para cada fingerprint de los extractos de *T. vulgaris*, se presenta un comportamiento proporcional con el cambio de solvente, de manera similar a los resultados obtenidos para *R. Officinalis*. Así se obtiene una mayor extracción de compuestos tipo polifenólicos en los extractos acetona y acetona 75-25%, lo cual se correlaciona con los resultados biológicos según el ensayo CPT (2.2.1). No obstante, los extractos evaluados de *T. vulgaris* presentan menos diversidad química que los extractos de *R. officinalis*. El fingerprint del extracto hexánico presentó únicamente 3 señales detectables, de las cuales la señal con mayor abundancia relativa se presentó en 20.7 min, la cual coincide con el tiempo de retención y espectro UV del timol. La presencia de esta señal prevalece en los extractos hasta el extracto acetona-agua 75-25% y la intensidad va disminuyendo conforme incrementa la polaridad de los extractos. Esta situación no es de extrañar debido a la característica apolar que presenta el timol respecto a los demás constituyentes reportados para *T. vulgaris*^{21,133,134}. El extracto que presentó mayor cantidad de señales fue el extracto acetona-agua 75-25% con 54 señales, de las cuales, la señal a 9.69 min presentó la mayor abundancia relativa respecto a las demás señales obtenidas. Esta señal se encuentra en los extractos acetato de etilo hasta acetona-agua 50-50%, con una mayor abundancia relativa en el extracto acetona-agua 75-25% siendo casi 3 veces superior que lo presentado en los demás extractos. Este compuesto coincide en tiempo de retención y espectro UV, con los obtenidos para el estándar ácido rosmarínico, metabolito el cual también se ha reportado en grandes cantidades para extractos de la especie *T. vulgaris*¹³⁵. En los extractos de *T. vulgaris* se presentó también la posible presencia de ácido cafeico, señal que se encuentra en el tiempo 4.9 min (figura 19 y 22).

Con el objetivo de obtener resultados un poco más concluyentes sobre la presencia de metabolitos reportados en los extractos evaluados de *T. vulgaris* se procede con la evaluación mediante LC-MS del extracto con mayor cantidad de señales encontradas mediante el fingerprint en HPLC-DAD, el cual para el caso de *T. vulgaris*, corresponde al extracto realizado con acetona-agua 75-25% (T4). El fingerprint para T4 se encuentra en la figura 23. Partiendo del análisis y basados en los reportes de los constituyentes para la especie, se

realizó la técnica de ion extraído para la identificación tentativa de los constituyentes del extracto.

Basados en las evidencias obtenidas en cuanto a la comparación de tiempos de retención, espectros UV y análisis LC-MS, se puede determinar la posible presencia de ácido rosmarínico y ácido cafeico en *T. vulgaris*. Estos compuestos se encuentran altamente relacionados con actividades antioxidantes y en algunos casos se les atribuyen propiedades cosméticas^{69,76,136}. En la figura 23 D se presenta un segmento del fingerprint para T4, en donde se observa dos señales de una abundancia relativa importante en 11.0 y 11.4 min las cuales no corresponden a ninguno de los estándares evaluados. Según el espectro de masas obtenido para la señal en 11 min, se podría inferir que corresponde a un derivado tipo flavona¹³⁷ con posible fórmula empírica $C_{15}H_{10}O_6$, debido al fragmento M-H 285. La señal en 11.4 puede corresponder a un glucósido de flavona puesto que estos compuestos presentan un m/z de 448 g/mol. Sin embargo, para corroborar la presencia de este tipo de compuestos o confirmar la presencia de los analitos mencionados, son necesarios estudios analíticos más robustos y de mayor resolución.

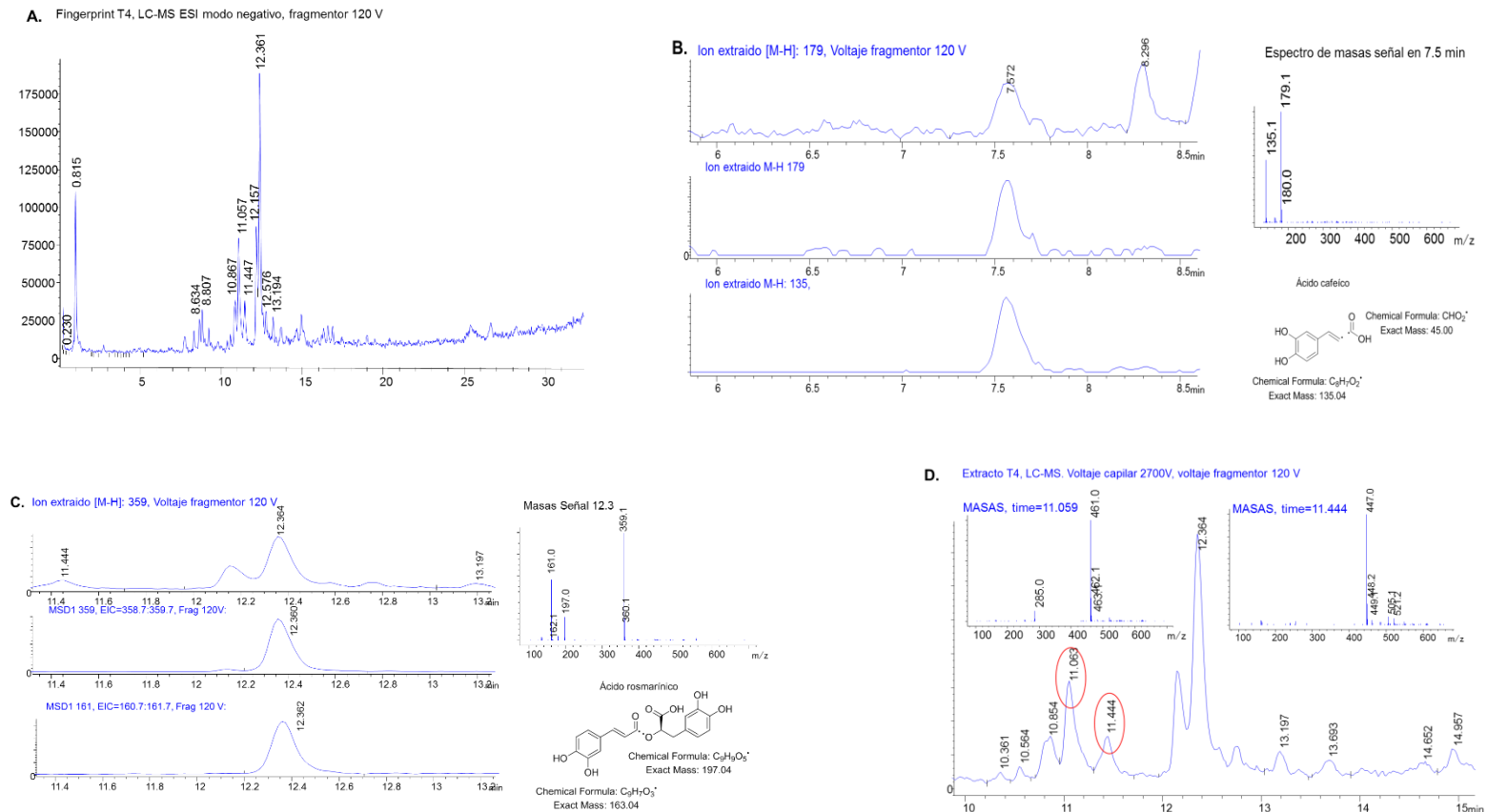


Figura 23. Cromatogramas mediante LC-MS para T4, condiciones para el detector voltaje capilar 2700 V voltaje del fragmentor 120 V, los espectros de masas fueron obtenidos en un rango de 200 a 1400. A) fingerprint extracto T4 ESI modo negativo scan. B) zona del cromatograma de 6 a 8 min, ion extraído M-H 179 y M-H 135 encontrado en el tiempo 7.5 min, a la derecha se encuentra el espectro de masas para la señal en 7.5 min y abajo la respectiva fragmentación para la cafeína. C) Zona del cromatograma 11-13 min, ion extraído M-H 359 presente en 12.36 min, se presenta el ion 161 presente en la fragmentación de ácido rosmarínico, a la derecha se presenta el espectro de masas obtenido para la señal a 12.36 min y en la parte inferior la respectiva fragmentación del ácido rosmarínico. C) espectros de masas de señales en 11 y 11.4 min.

4.2.1.3 Fingerprint *Smallanthus sonchifolius*

Los extractos de la especie *S. sonchifolius* evaluados no presentaron una gran variabilidad química. En los fingerprint obtenidos bajo el método cromatográfico establecido en 4.1.4, se presentaron coincidencias con el tiempo de retención y con el espectro UV de ácido clorogénico y ácido cafeíco. Éstas señales se encuentran presentes en los extractos de mezclas acetona-agua (75-25%; 50-50% y 25-75%), aunque en una baja abundancia relativa respecto a otras señales como la encontrada en 5.8 min, la cual no coincide con ningún estándar evaluado (Figura 24).

Los extractos de *S. sonchifolius* presentan el mismo comportamiento que *T. vulgaris* y *R. officinalis* respecto a la diversidad química según el solvente de extracción. Los extractos hexánico y acuoso presentaron pocas señales y de intensidades muy bajas. El número de señales incrementa a medida que los solventes adquieren un punto medio de polaridad (constante dieléctrica intermedia en el rango usado) hasta el extracto acetona-agua 50-50%, en el cual se llega a un máximo de 22 señales a 280 nm, longitud donde se presenta mayor cantidad de señales. En los extractos realizados con mezclas de acetona-agua se obtuvo una señal con la mayor abundancia relativa en 5.7 min, cuyo espectro UV corresponde al de un ácido fenólico¹³⁸. La presencia de ácidos fenólicos como cafeíco, clorogénico y derivados de éste se encuentran reportados para las hojas de *S. sonchifolius*^{97,98,139}.

Con el objetivo de determinar los posibles constituyentes en las hojas de *S. sonchifolius*, fue seleccionado el extracto acetona-agua 50-50% (HY5) para el análisis mediante LC-MS, con el objetivo de determinar posibles constituyentes en la especie. El fingerprint mediante LC-MS se encuentra en la figura 25. En el análisis realizado se encuentran algunas discrepancias respecto a los tiempos de retención y señales encontradas mediante HPLC-DAD, lo cual se deriva de cambios en el desarrollo analítico como la disminución del flujo de la columna. Derivado del análisis mediante LC-MS, es posible que los ácidos cafeíco y clorogénico sean parte de los constituyentes del extracto de *S. sonchifolius*, además según la evidencia reunida, es posible que exista presencia de otros derivados de ácidos fenólicos esterificados, toda vez que la señal en 21 min presenta un ion molecular de m/z 353, un marcador de éste tipo de analitos¹³¹

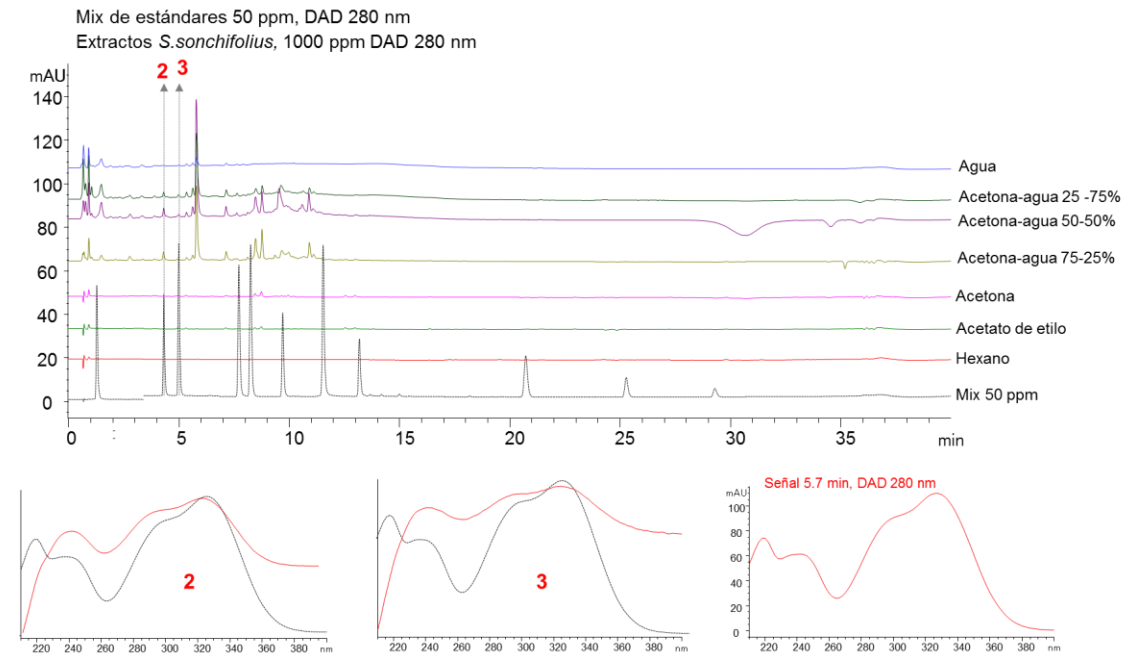


Figura 24. Fingerprint de extractos *S. sonchifolius*, abajo espectros UV de la señal 2 y 3 tanto de la muestra (rojo) como de la presentada por el mix de estándares (negro).

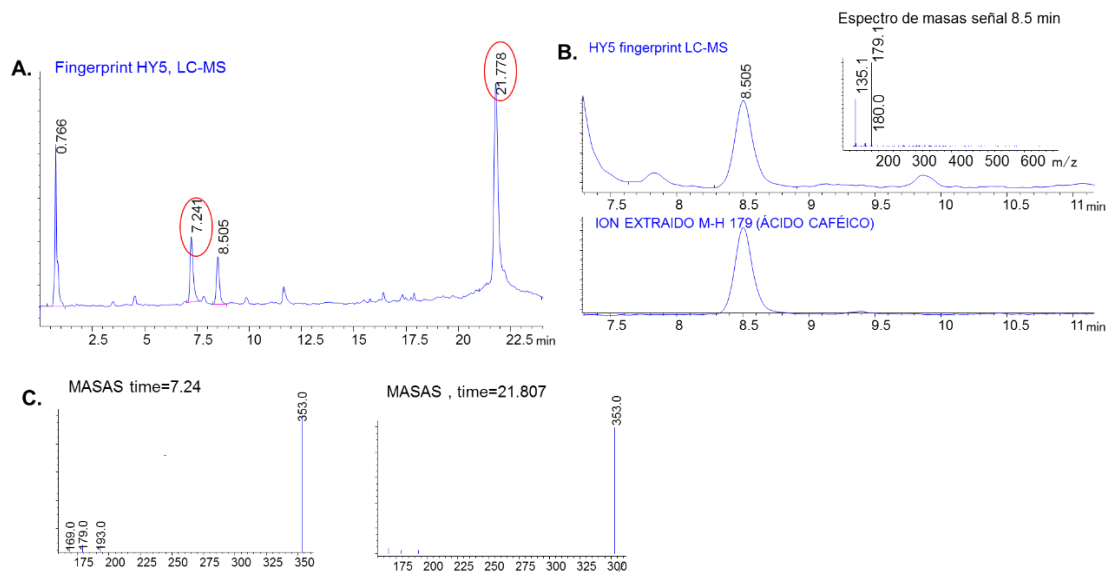


Figura 25. Fingerprint HY5 LC-MS voltaje capilar 2700V, voltaje fragmentor 120V. A) fingerprint HY5. B) ion extraído M-H 179 con el respectivo espectro de masas. C) espectros de masas para las señales en 7.2 y 21 min.

4.2.2 Determinación de posibles metabolitos responsables de las actividades antioxidante y antienvjecimiento de las especies *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*

En la investigación de los productos naturales, uno de los principales objetivos es la determinación de compuestos bioactivos, ya sea conocido o un metabolito nuevo que pueda ser prometedor. La identificación de compuestos bioactivos en matrices complejas es esencial en la determinación de productos naturales de interés. Para lograr esta identificación, se utilizan diversas metodologías y una de las más recientes versa en la actividad contrastada con los perfiles HPLC, debido a su versatilidad y porque puede ser extrapolada a varios modelos. De esta forma se permite la detección de moléculas promisorias inclusive en muestras complejas como los son los extractos vegetales^{125,126}, donde pequeñas diferencias en el perfil cromatográfico pueden generar grandes cambios en la bioactividad debido a la presencia de efectos sinérgicos y antagonistas de las moléculas. En concordancia con lo anterior, es posible correlacionar señales obtenidas mediante análisis de fingerprint de extractos vegetales, con una actividad específica. Lo anterior permite no solo el aislamiento dirigido de metabolitos promisorios, también la posibilidad de estandarizar un ingrediente natural con base en sus metabolitos activos, una situación altamente conveniente en la industria cosmética. De hecho, los ingredientes estandarizados ayudan a garantizar la seguridad y eficacia de un producto farmacéutico elaborado con base en fuentes naturales.

La aplicación de herramientas analíticas y estadísticas permite la discriminación y clasificación de los extractos tanto en composición química como en su relación con la bioactividad que presentan. Esta clasificación puede ayudar a la distinción de metabolitos responsables de una actividad biológica. En este sentido, se aplicaron diferentes modelos de análisis multivariado tales como análisis exploratorios (PCA), patrones de reconocimiento (PLS-DA), análisis de similiaridad (coeficientes de correlación) y calibraciones multivariadas (PLS) para la determinación de posibles señales o metabolitos responsables de las propiedades antienvjecimiento y antioxidantes observadas en los extractos de las especies *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*.

Gracias a la composición química experimental (4.2.1) como a la reportada (Tabla 2), se logró determinar que la gran mayoría de los constituyentes de los extractos eran de naturaleza fenólica. Por lo anterior se planteó un modelo de análisis multivariado tomando la totalidad de los constituyentes de los extractos para realizar un análisis de comparación y discriminación entre las muestras para posteriormente ser soportados mediante análisis de correlación entre cada una de las especies con el fin de generar un pseudovalidación de los resultados.

4.2.2.1 *Análisis de componentes principales PCA*

El PCA es una de las técnicas exploratorias más comunes en el análisis metabolómico no sesgado, que permite representar una tabla de datos multivariados en un espacio de baja dimensionalidad, en donde las variables originales son transformadas en variables latentes que resumen los patrones sistémicos de variación entre los datos^{55,125}. El primer componente representa una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas, con el fin de explicar el máximo de la varianza total del espacio original. El segundo componente principal es ortogonal al primero y explica el máximo de la varianza residual, y así con el resto de la varianza que esté explica. La interpretación de las gráficas está basada en grupos de observaciones, tendencias y valores extremos cuando se etiquetan los datos de acuerdo a la información previa, tal como especies, tipos de extractos, actividad entre otras¹⁴⁰. En la figura 26 se presenta el PCA para las 3 especies y los constituyentes encontrados mediante el análisis de fingerprint a las cuatro longitudes de onda utilizadas (254, 280, 320 y 360 nm). Se obtuvo un total de 253 señales para los 21 extractos, los cuales se encuentran representadas en la gráfica por especies (en negro *R. officinalis*, azul *T. vulgaris*, verde *S. sonchifolius*). En la parte superior derecha se presenta la gráfica de scores, la cual da una indicación de las diferencias de los extractos en cuanto a similitud química, y las gráficas de loadings dan una indicación sobre los metabolitos representativos en los clúster formados en la gráfica de scores.

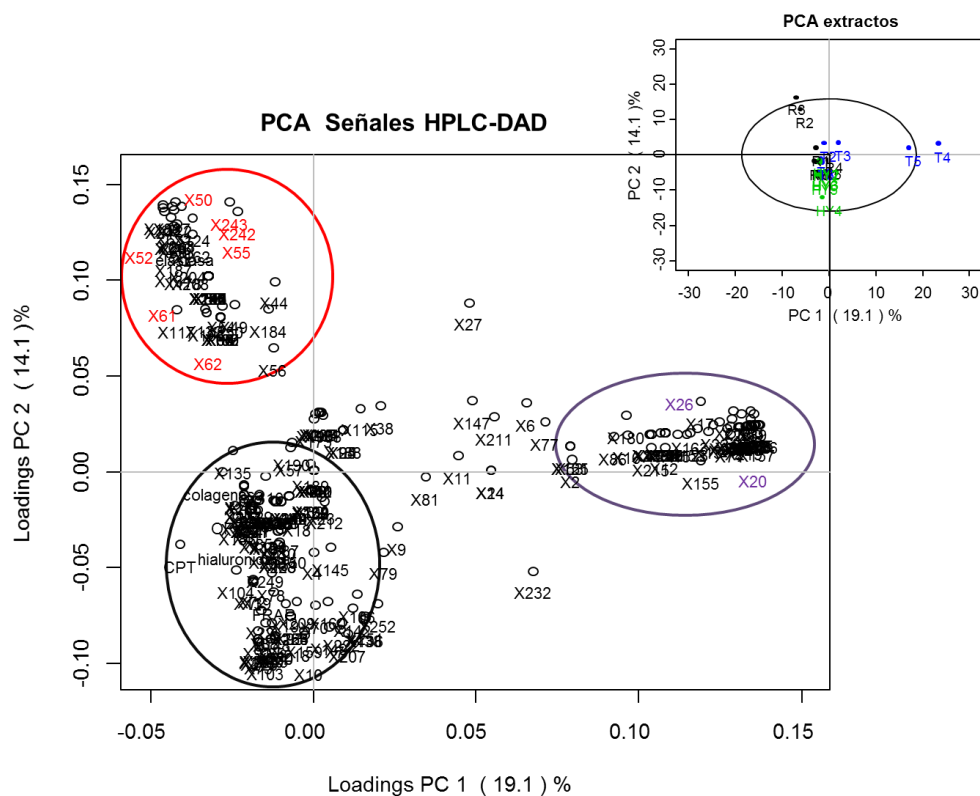


Figura 26. Análisis de componentes principales de los 21 extractos pertenecientes a las especies *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*. El gráfico superior presenta la agrupación de los extractos, el gráfico inferior basado en las señales encontradas mediante HPLC-DAD para los 21 extractos.

El PCA logra dividir tanto los extractos como los constituyentes (representados mediante las señales en HPLC-DAD). Se presentan tres clúster principales, a pesar que los componentes principales únicamente explican un 33.2% de la varianza total, indicando que no existe una separación completa entre los extractos. Los clúster se encuentran encerrados en círculos: en el círculo demarcado con rojo se encuentran los extractos R2 y R3; en el círculo purpura los extractos T4 y T5 y un tercer círculo negro representa los demás extractos. Mediante este PCA fue posible determinar diferencias en cuanto a la composición de los extractos de *R. officinalis* de carácter apolar, ubicado en el cuadrante II del gráfico y los extractos de polaridad intermedia de *T. vulgaris*, ubicados en el lado positivo del primer componente. Se encontró que los metabolitos que permiten esta diferenciación fueron aquellas que mediante

HPLC-DAD-MS posiblemente correspondían a rosmanol, epirosmanol, isorosmanol (X50, X52, X243), carnosol (X62) y rosmadial (X61). Mientras que en el caso de los extractos T4 y T5 los metabolitos que permitieron su agrupación correspondía entre muchas otras a señales como X26, la cual corresponde a un tiempo de retención de 9.6 y cuyos espectros de masas, UV y tiempo de retención corresponde con los encontrados para ácido rosmarínico. Debido a que no se logró observar una separación importante y representativa entre los extractos, y principalmente en el clúster 3 (negro) se presenta la unión de extractos polares y apolares de las tres especies ya que no se pueden determinar diferencias entre ellos con esta metodología.

4.2.2.2 Análisis multivariado aplicados a la determinación de metabolitos responsables de las propiedades antioxidantes y antienvjecimiento

Con el propósito de mostrar los resultados de una manera entendible y ordenada en este punto se describen los diferentes análisis multivariados discriminantes realizados a los extractos con base en su actividad biológica y composición química, los resultados serán presentados inicialmente para la totalidad de los extractos y posteriormente la importancia determinada de una señal X, será validada para cada especie mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Así inicialmente se presentarán los resultados para cada una de las actividades biológicas para los 21 extractos y posteriormente se presentara el coeficiente de correlación basada en la actividad dada para cada una de las especies.

4.2.2.2.1 Análisis discriminante de mínimos cuadrados (PLS-DA)

El PLS-DA es un análisis supervisado de patrones de reconocimiento, los cuales divergen de los análisis exploratorios como PCA en la forma de discriminación de los datos. La información es descrita en respuesta a un vector y, el cual con base en información previa, se

desarrollan guías y reglas para la clasificación de nuevas muestras. Usualmente la información y representa las clases en las cuales los datos pueden ser categorizados como lo son: especie, parte usada, polaridad del extracto o como será descrito para éste caso, con una determinada actividad^{55,125}. La interpretación de los gráficos es progresivamente más complicada al incrementar el número de clases. En éste caso las muestras fueron clasificadas en tres clases basadas en las actividades antioxidantes y antienvjecimiento (inhibición de enzimas colagenasa, elastasa e hialuronidasa, sección 2.2.2), clasificación inactiva (rojo), medianamente activas (azul) y activas (verde). Se presentan los gráficos de scores (extractos) y loadings (composición química) para el análisis de PLS-DA para cada propiedad biológica de los 21 extractos.

4.2.2.2.2 Calibraciones multivariadas por análisis de mínimos cuadrados parciales

Las calibraciones multivariadas son un modelo de calibración multivariado, el cual para el análisis de extractos naturales, modela una propiedad continua en función de sus metabolitos reconocidos (señales HPLC). Similar a PLS-DA, estos modelos son construidos con base en un set de datos y la complejidad óptima del modelo y su habilidad predictiva pueden ser evaluados por la predicción de un set de prueba o por una validación cruzada de un set de calibración. El modelo puede ser aplicado en muestras desconocidas para predecir el valor de la propiedad evaluada, a partir de la composición química, es decir, predecir marcadores de actividad biológica. Entre estas técnicas de calibración multivariada se encuentran los análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) y de regresión de componentes principales (PCR), entre otros. Cada modelo posee sus propias ventajas y desventajas. Por ejemplo, el PCR permite el análisis de diversas variables, pero los coeficientes de correlación generados con las respuestas pueden ser cuestionados, ya que sus componentes seleccionados son creados solo con base en variaciones de la matriz de datos x , y después las predicciones, son modeladas como función de una propiedad. Contrario al caso del modelo PLS, en donde las variables latentes son creadas con base en la covarianza maximizada entre la matriz de datos x y la respuesta en el vector y . Lo anterior hace de PLS una herramienta estadística

ampliamente usada y con gran poder predictivo, pero la interpretación de los coeficientes de regresión puede ser complicada, más aun en muestras biológicas complejas, debido al modelamiento de pequeñas variaciones ortogonales en la matriz de datos x ^{55,125}. Sin embargo, en este estudio no se pretende realizar predicciones de actividad, únicamente se determinarán coeficientes de regresión y con base en su magnitud serán propuestos metabolitos o señales potencialmente responsables de las diferentes actividades evaluadas.

4.2.2.2.3 Correlaciones de Pearson

La determinación de los coeficientes de correlación, es una de las herramientas para el análisis de similiaridad más comunes y fáciles de aplicar. Para el caso del análisis de perfiles metabólicos de extractos, es adecuado el uso de extractos estandarizados. Sin embargo, la mayoría de los estudios son enfocados al estudio de extractos no estandarizados y en algunos casos con poco conocimiento sobre la composición química. Los rangos de similiaridad se encuentran entre -1 y 1, donde 0 muestra que no existe similiaridad¹²⁵, 1 expresa la mayor proporcionalidad y -1 expresa una relación inversamente proporcional, la cual es difícil de interpretar en la mayoría de actividades biológicas, aunque como ejemplo para el caso de actividades antioxidantes, se puede presentar un coeficiente de correlación cercano a -1 cuando el metabolito presenta efectos pro oxidantes. Esta técnica será usada para la validación de los posibles metabolitos y/o señales que representen alto nivel de correlación mediante las anteriores técnicas estadísticas con alguna de las actividades biológicas evaluadas.

4.2.3 Actividad anti-colagenasa

En la figura 27 se presentan los diversos análisis multivariados discriminantes de los extractos con base en la actividad enzimática anti-colagenasa. En la figura 25A se presenta el análisis de PLS-DA para los 21 extractos divididos en tres clases: inactivos (rojo), medianamente activos (azul) y activos (verde), los cuales presentaron un total de 253 señales

en HPLC-DAD a 254, 280, 320 y 360 nm. Las señales del loading marcadas en rojo representan señales de HPLC-DAD que coincidieron en tiempo y espectro UV con los estándares evaluados. Para complementar el anterior análisis en la figura 25 B, se presentan los coeficientes de regresión mediante PLS de las señales correspondientes a los fingerprint de los 21 extractos con base en la actividad anti-colagenasa. Finalmente en 25C-25E se presenta un estudio de correlación de Pearson para cada una de las especies por separado basada en la actividad anti-colagenasa.

El análisis de PLS-DA basado en la actividad anti-colagenasa y las señales obtenidas mediante los fingerprint para los 21 extractos, representa el 24.2% de la varianza total de las muestras, donde el componente 1 representa un 12.2% de la varianza total y el componente 2 representa 12%. A pesar que no se logra generar una diferencia entre los extractos poco activos y activos, si hay una diferencia entre aquellos que poseen algún tipo de actividad (verde y azul) situándose en el lado izquierdo del score, respecto a los que se presentan como inactivos (rojo) que se encuentran en el lado positivo del componente 1. En el gráfico del loading, con el cual se genera la discriminación respecto a las señales encontradas en el fingerprint, se logran aglomerar las señales en 3 grupos en el cuadrante II y cuadrante III. Basados en esta discriminación se logró determinar la presencia de metabolitos que se encuentran relacionados con los extractos activos y medianamente activos. En el primer grupo se presentan las señales X231-X235 las cuales corresponden a señales presentadas por *R. officinalis* en la zona de fingerprint de 10 min a 13 min aproximadamente (figura 19), además se presentan metabolitos que según las evidencias obtenidas en la caracterización química podrían corresponder a algunos de los estándares usados como X62 (25.2 min, carnosol), X50, X52 y X55 (17.5, 18.1 y 19.5 min respectivamente, probablemente isómeros de rosmanol). En el segundo grupo, el cual corresponde a la zona de extractos medianamente activos se observaron señales como X219 (8.2 min tentativamente ácido isoferúlico), X156 (7.7 min tentativamente ácido ferúlico), X26 (9.6 min, correspondencia con ácido rosmarínico).

Con el objetivo de reunir mayor evidencia para la determinación de posibles señales responsables de la actividad anti-colagenasa, el análisis de calibración multivariada PLSR

(figura 26B), permite establecer que los metabolitos que presentaron mayor coeficiente de correlación correspondían con las señales: X40 (12.9 min, presente en extractos de *R. officinalis*) y X99 (10.4 min, presente en *R. officinalis*): Lo anterior se confirma con las señales X167 y X227, las cuales corresponden a la misma señal en 10.4 min, pero a las longitudes de onda 254 y 360 nm, respectivamente. Sin embargo, estos metabolitos no presentaron una correlación de Pearson representativa. Esto podría ser consecuencia del bajo porcentaje de varianza explicada o posibles efectos sinérgicos existentes entre estos metabolitos y otros que no pueden ser explicados mediante esta herramienta estadística. No obstante, y basados en los resultados del análisis multivariado, es posible que los metabolitos encontrados en la zona cromatográfica t10 min a t13 min en los extractos de *R. officinalis* sean claves para la inhibición de la enzima colagenasa.

4.2.4 Actividad anti-elastasa.

En la figura 28 se presentan los diferentes análisis multivariados discriminantes realizados para los extractos con base en la actividad anti-elastasa. En el análisis discriminante PLS-DA, el gráfico de score permite expresar el 30.3% de la varianza total de las muestras. En este gráfico se logran diferenciar las tres clases de extractos activos, medianamente activos y poco activos, e igualmente en el loading se logran diferenciar 3 secciones de los metabolitos, en el cuadrante II se presentan aquellos que correlacionan con los extractos activos (R2 y R3) y en el cuadrante III se encuentran los metabolitos presentes en los extractos medianamente activos (R1, R4, T5 y T4). En el clúster de los metabolitos presentes en los extractos activos se logran detectar señales como X50, X52, X55 (17.5, 18.1 y 19.5 min respectivamente, que podrían corresponder a isómeros de rosmanol), X61 (23 min, según espectro de masas podría corresponder a rosmadial), X62 (25.2 min, según evidencia cromatográfica puede corresponder a carnosol). Mediante el análisis de calibración PLSR se encontró que las señales X52, X187 (18.1 min, isómero de rosmanol), X62 (25.1 min, carnosol) X132, X198 (23 min, posiblemente rosmadial) y X201 (señal en 33.4 min) presentaban altos coeficientes de correlación respecto a la actividad anti-elastasa.

Mediante el coeficiente de correlación de Pearson, se logra determinar que efectivamente las señales en la zona 15-25 min en los extractos de *R. officinalis*, en las cuales se encuentran las

señales determinadas previamente, presentan el mayor coeficiente de correlación respecto a la actividad anti-elastasa. Por lo cual se podría establecer que la presencia de compuestos fenólicos tipo rosmanol, rosmadial y carnosol son responsables de la actividad anti-elastasa presentada en los extractos de *R. officinalis*.

4.2.5 Actividad anti-hialuronidasa

Los análisis multivariados discriminantes realizados con base en las señales obtenidas mediante HPLC-DAD en los fingerprint de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*, en relación a la actividad anti-hialuronidasa, son presentados en la figura 29. Para los extractos evaluados, la gráfica score (figura 28A superior derecha) expresa el 13.8% de la variabilidad total de los datos, y permite una mediana clasificación de los extractos activos ubicados en el cuadrante IV en inactivos, los cuales se distribuyen en el resto del gráfico. La grafica de loadings se puede observar que entre los metabolitos (con identificación tentativa) presentes en mayor proporción en los extractos activos se encuentra la señal X4 (4.3 min, ácido clorogénico) y X80 (6.0min, derivado de ácido clorogénico). En la figura 27B se muestran los coeficientes de regresión obtenidos mediante el análisis de PLS. Entre las señales que presentan un mayor coeficiente de correlación se presentan X10, X80 y X150 los cuales corresponden a la misma señal en 6.0 min presente en los extractos de polaridad intermedia de hojas de yacón, y X157 y X219 que corresponden a las señales a 8.1 min, no identificado. Sin embargo, posiblemente a los bajos porcentajes de variabilidad encontrados en los análisis multivariados discriminados, no es posible confrontar los resultados con los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos para cada una de las especies, en el cual las señales determinadas previamente no presentan un coeficiente de correlación representativo. En todo caso, la evidencia obtenida mediante los ensayos biológicos puede indicar que las señales en 6 y 8.1 poseen gran responsabilidad en la bioactividad determinada para los extractos de *S. sonchifolius*.

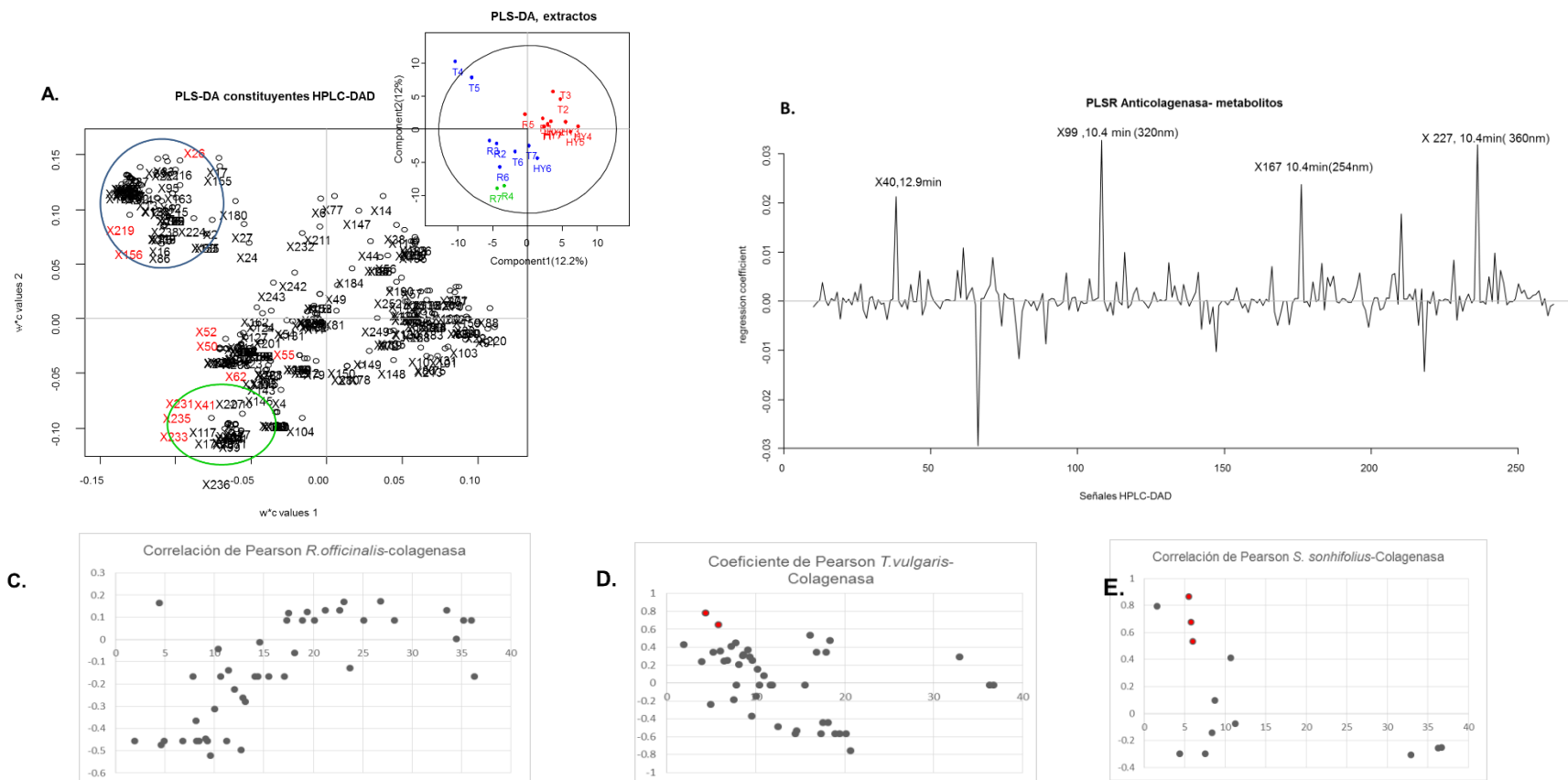


Figura 27. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad anti-colagenasa. A) PLS-DA basados en las señales obtenidas en los fingerprint de los extractos y la actividad anti-colagenasa. Grafica scores representa las clases de los extractos. Activos (verde), medianamente activos (azul) no activos (rojo). B) PLS de las señales obtenidas en HPLC-DAD mediante fingerprint y la actividad anti-colagenasa. C) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-colagenasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *R. officinalis*. D) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-colagenasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *T. vulgaris*. E) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-colagenasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *S. sonchifolius*.

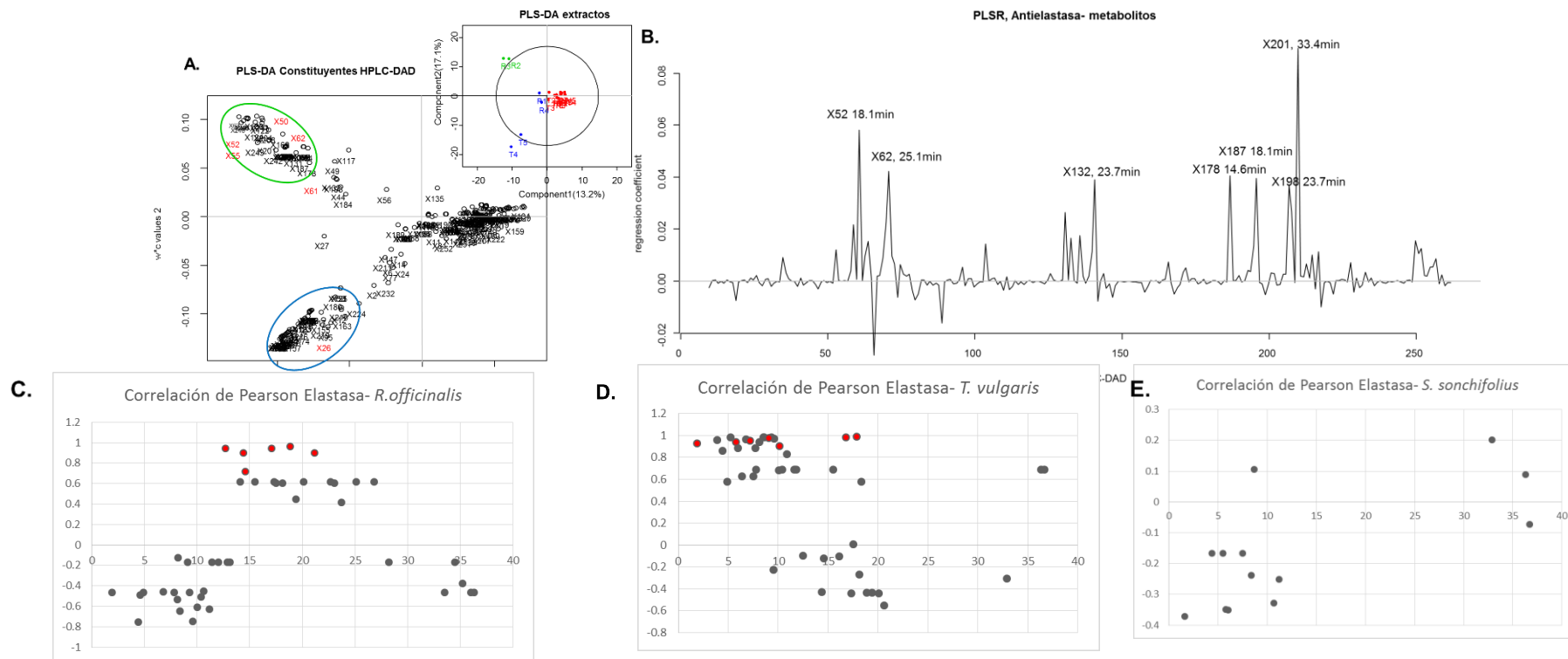


Figura 28. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad anti-elastasa. A) PLS-DA basados en las señales obtenidas en los fingerprint de los extractos y la actividad anti-elastasa. Grafica scores representa las clases de los extractos. Activos (verde), medianamente activos (azul) no activos (rojo). B) PLS de las señales obtenidas en HPLC-DAD mediante fingerprint y la actividad anti-elastasa. C) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-elastasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *R. officinalis*. D) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-elastasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *T. vulgaris*. E) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-elastasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *S. sonchifolius*.

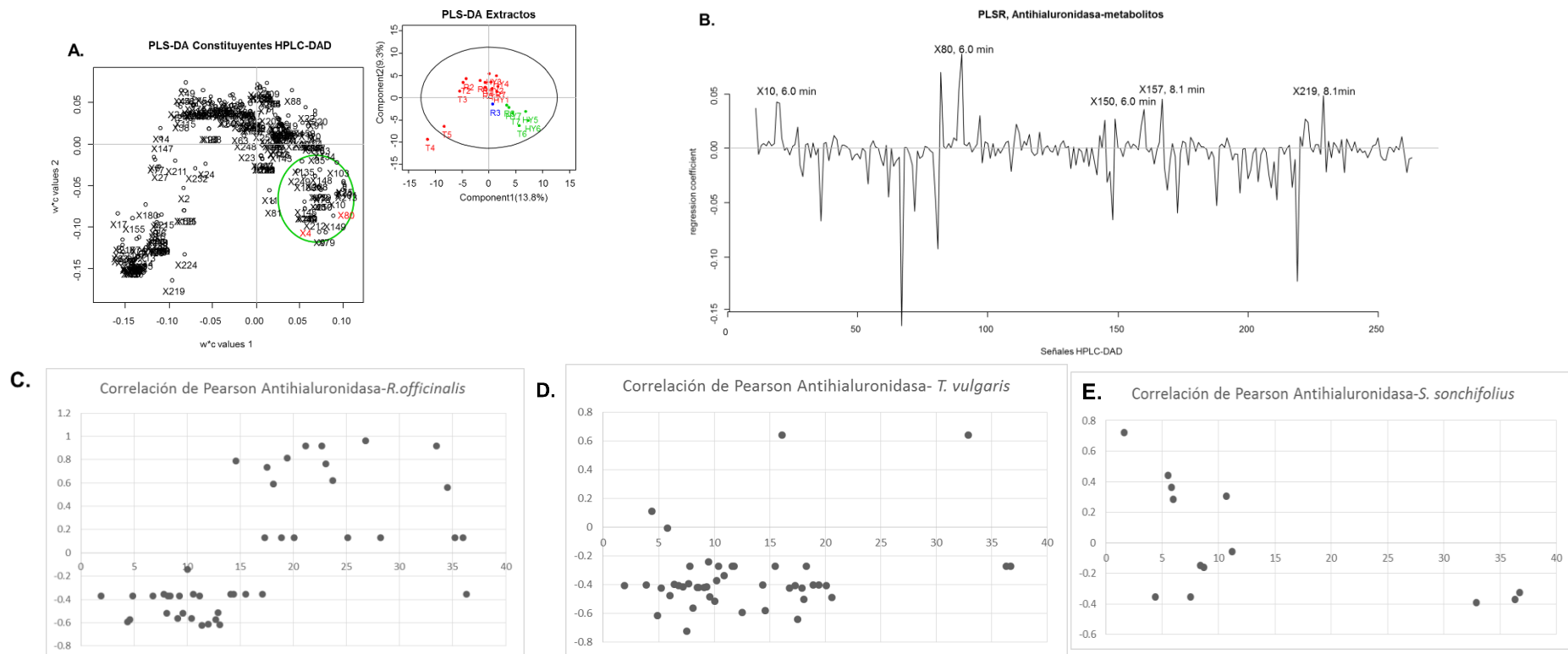


Figura 29. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad anti-hialuronidasa. A) PLS-DA basados en las señales obtenidas en los fingerprint de los extractos y la actividad anti-hialuronidasa. Grafica scores representa las clases de los extractos. Activos (verde), medianamente activos (azul) no activos (rojo). B) PLS de las señales obtenidas en HPLC-DAD mediante fingerprint y la actividad anti-hialuronidasa. C) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-hialuronidasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *R. officinalis*. D) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-hialuronidasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *T. vulgaris*. E) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad anti-hialuronidasa de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *S. sonchifolius*

4.2.6 Propiedades antioxidantes de los extractos *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius*

Con el objetivo de determinar la correlación existente entre las señales obtenidas en los fingerprint de los extractos mediante HPLC-DAD con respecto a las actividades antioxidantes (ORAC y FRAP), se realizaron análisis multivariados discriminantes basados en estas dos actividades, y los resultados para los extractos son presentados en la figura 30 (ORAC) y 31 (FRAP). Para la actividad antioxidante evaluada mediante el ensayo FRAP, el ensayo PLS-DA logra explicar el 25.6% de la variabilidad de las muestras, y permite la clasificación de los extractos de manera parcial en el gráfico score, pues únicamente se logran diferenciar los metabolitos que presentan actividad (alta o media) ubicados en los cuadrantes III y IV, de los no activos, ubicados en el cuadrante I. Con base en esa discriminación, fue posible determinar la presencia de algunas señales como lo son X41 (13.1 min, tentativamente luteolina) y X26 (9.6 min, ácido rosmarínico).

Para el caso del PLS-DA basado en la actividad antioxidante evaluada mediante ORAC, los componentes del análisis discriminado logran explicar el 26% de la variabilidad en las muestras. Como en el caso anterior no se presentó una separación entre las tres clases de metabolitos, se obtuvo entonces una diferenciación parcial en el gráfico score. Se logran diferenciar los extractos activos ubicados en la parte superior del gráfico, y aquellos con polaridad intermedia y nula se encuentran ubicados en la parte inferior. Se detectaron algunas señales que podrían corresponder a los estándares evaluados como los es X26 (9.6 min, ácido rosmarínico), X157 (8.23 min, tentativamente ácido isoferúlico) y X77 (4.9 min, ácido cafeíco). Es notoria la presencia de ácido rosmarínico dentro de los clúster de los extractos activos, y dado la variedad de reportes sobre su actividad antioxidante^{20,128,135,141} es posible que éste compuesto sea uno de los principales involucrados en las actividades antioxidantes que presentan los extractos, específicamente de *R. officinalis* y *T. vulgaris*.

Para ambas pruebas se realizó el análisis de calibración PLSR, con el fin de identificar metabolitos que presenten altas correlaciones respecto a las actividades biológicas. Tanto para ORAC como para FRAP se presentan algunas señales con altos coeficientes de

correlación que corresponden con la señal en 9.6 min, la cual mediante las técnicas cromatográficas con tiempo de retención, espectro UV y fragmentación mediante LC-MS, correspondía con el ácido rosmarínico. Por consiguiente, es posible que el ácido rosmarínico sea el responsable de la actividad antioxidante, al menos en *T. vulgaris* y *R. officinalis*. Estas especies presentan un comportamiento tipo gaussiano alcanzado un máximo de actividad antioxidante (figura 7) en solventes de polaridad intermedia, punto en el cual la señal de ácido rosmarínico incrementa considerablemente (figura 19 y 22).

Con respecto a las actividades de inhibición enzimática, no es posible establecer o predecir un comportamiento con base en los metabolitos presentes como se puede estipular para el caso de ácido rosmarínico debido a la falta de uniformidad en la actividad de dichas inhibiciones enzimáticas. Aunque para tener certeza en cuanto a la identidad de las señales obtenidas en los fingerprint, bajo las evidencias obtenidas en éste estudio, es posible determinar algunas señales que probablemente se encuentren relacionados con actividades biológicas como las evaluadas (inhibición de colagenasa, elastasa e hialuronidasa). Para el caso de la actividad anti-colagenasa, los extractos que se encontraron más activos pertenecían a la especie *R. officinalis*. Gracias a las herramientas estadísticas empleadas para la determinación de posibles señales responsables de la actividad, fue posible identificar que la zona del fingerprint de 10 min a 13 min para los extractos de *R. officinalis* poseen una gran importancia biológica en cuanto a la actividad de inhibición de colagenasa, ya que las señales detectadas en esta zona presentan altos coeficientes de correlación con la actividad de inhibición de colagenasa y se presentan en las zonas de aglomeración identificadas como más activas en los análisis de discriminación de muestras. Con respecto a las especies *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* no se presentaron altas correlaciones de las señales presentadas en los fingerprint con la actividad anti-colagenasa, por lo tanto no es posible determinar correlaciones biológicamente relevantes de los constituyentes de estas especies con la actividad de inhibición de colagenasa.

En cuanto a la actividad anti-elastasa, los metabolitos que tentativamente corresponden a los isómeros de rosmanol, rosmadial y carnosol parecen ser los responsables de las actividades encontradas en los extractos más activos, los cuales correspondieron a R2 y R3. La actividad

anti-hialuronidasa presentó bajos coeficientes de correlación con las señales obtenidas de los fingerprint, sin embargo, los análisis multivariados discriminados arrojaron las señales que posiblemente corresponden a ácido clorogénico y la señal no identificada en 5.8-6.0 min como los posibles responsables de la actividad, al menos en los extractos de la especie *S. sonchifolius*.

Los resultados obtenidos durante esta investigación, en los cuales se presentan metabolitos de diversas características como responsables de las actividades anti-envejecimiento evaluadas, permiten concluir que la combinación de extractos podría ser la clave para la obtención de ingredientes comercial y biológicamente importantes. Donde la combinación de metabolitos con diversos efectos anti-envejecimiento y antioxidantes podrían dar paso a efectos sinérgicos incrementando así la eficacia y posibilitando la acción fotoprotectora mediante diversos mecanismos de acción.

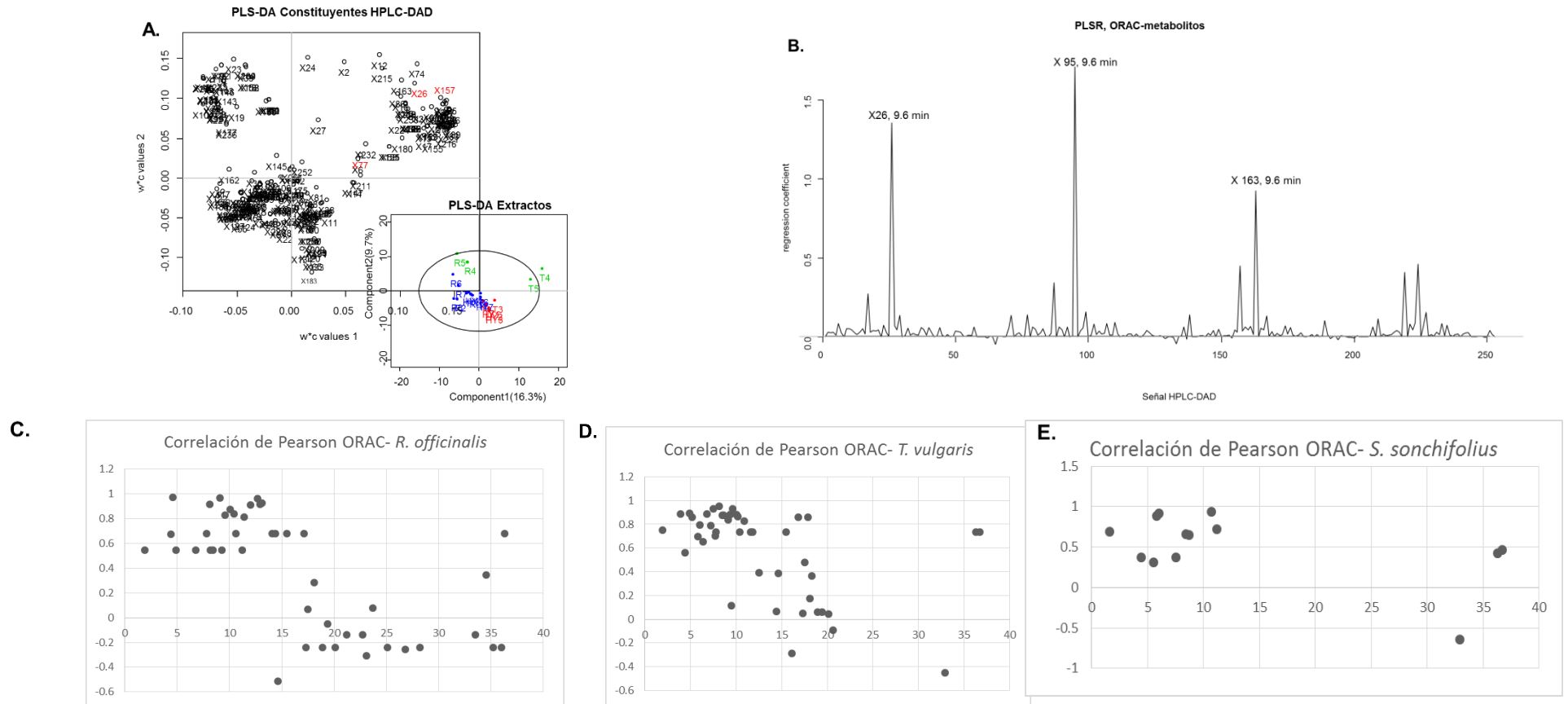


Figura 30. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad antioxidante (ORAC). A) PLS-DA basados en las señales obtenidas en los fingerprint de los extractos y la actividad antioxidante (ORAC). Gráfica scores representa las clases de los extractos. Activos (verde), medianamente activos (azul) no activos (rojo). B) PLS de las señales obtenidas en HPLC-DAD mediante fingerprint y la actividad antioxidante (ORAC). C) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad antioxidante (ORAC) de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *R. officinalis*. D) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad antioxidante (ORAC) de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *T. vulgaris*. E) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad antioxidante (ORAC) de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *S. sonchifolius*

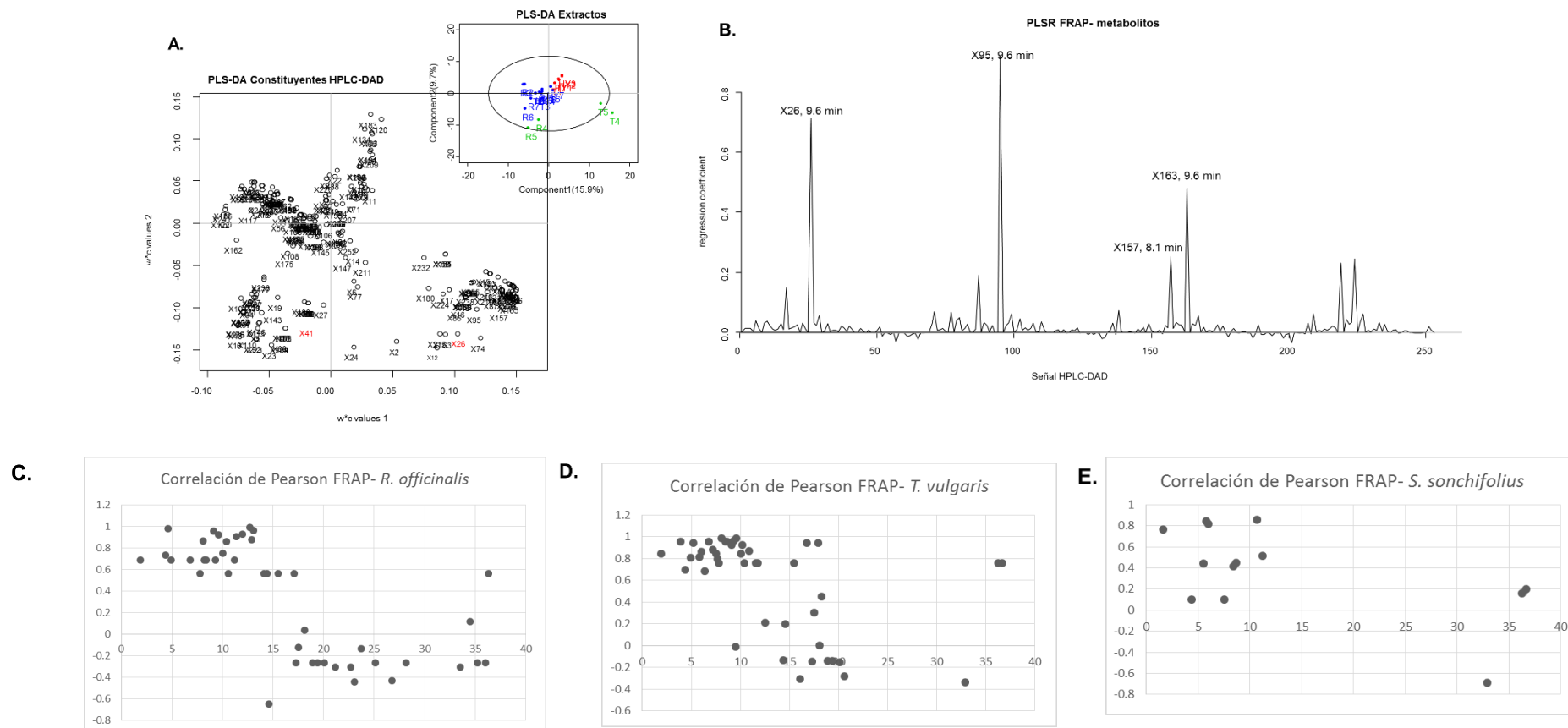


Figura 31. Análisis multivariados discriminantes de los extractos de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *S. sonchifolius* con base en la actividad antioxidante (FRAP). A) PLS-DA basados en las señales obtenidas en los fingerprint de los extractos y la actividad antioxidante (FRAP). Gráfica scores representa las clases de los extractos. Activos (verde), medianamente activos (azul) no activos (rojo). B) PLS de las señales obtenidas en HPLC-DAD mediante fingerprint y la actividad antioxidante (FRAP). C) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad antioxidante (FRAP) de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *R. officinalis*. D) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad antioxidante (FRAP) de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *T. vulgaris*. E) coeficiente de correlación de Pearson basada en la actividad antioxidante (FRAP) de las señales en HPLC-DAD encontradas para extractos de *S. sonchifolius*

5 CONCLUSIONES

Entre las especies evaluadas se determinó que *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y las hojas de *Smallanthus sonchifolius*, presentan la mayor capacidad de inhibición de las enzimas elastasa e hialuronidasa las cuales se encuentran íntimamente relacionadas con el proceso de fotoenvejecimiento, así como las propiedades antioxidantes más relevantes entre las siete especies evaluadas en éste trabajo. Además, basados en un estudio integrado de mecanismos involucrados en el proceso del fotoenvejecimiento, se logró determinar que los extractos de estas tres especies poseen propiedades fotoprotectoras. Lo anterior debido a la capacidad de disminuir la producción de MMP-1 y los niveles de ROS intracelular, y de incrementar los niveles de pro-colágeno tipo I α 1 en HDFa estimulados con radiación UVB. La especie *R. officinalis* presentó la propiedad fotoprotectora más relevante entre las tres especies evaluadas, al disminuir en mayor medida la producción de MMP-1 y los niveles intracelulares de ROS.

Con respecto a la selección de solventes para el desarrollo de extractos, la propiedad fisicoquímica constante dieléctrica se convierte en un factor de suma importancia para la obtención de extractos bioactivos, siendo aquellos realizados con acetona-agua, los extractos que presentaron las mejores propiedades anti-envejecimiento en este estudio. Igualmente, se desarrolló un método analítico mediante HPLC-DAD-MS para el estudio de los fingerprints de los extractos bioactivos. Se demostró que la composición química de los extractos varía de manera proporcional con el incremento de la constante dieléctrica, siendo aquellos extractos con valores intermedios, los que presentaron la mayor variabilidad química.

Las técnicas analíticas utilizadas permitieron la determinación de compuestos tipo ácidos fenólicos, flavonoides y derivados terpénicos de carácter fenólico en los extractos de *R. officinalis*. El estudio químico arrojó el ácido rosmarínico y el timol como posibles constituyentes mayoritarios de la especie *T. vulgaris*. Para el caso de las hojas de *S. sonchifolius* se evidenció la presencia principalmente de compuestos tipo ácidos hidroxicinámicos y especialmente derivados de ácido clorogénico.

Usando herramientas estadísticas de análisis multivariado basados en la discriminación, similitud y agrupamiento, apoyado de la caracterización química, se desarrolló un método rápido y sencillo para la identificación tentativa de señales (metabolitos) responsables de las propiedades anti-envejecimiento evaluadas en *R. officinalis*, *T. vulgaris* y hojas de *S. sonchifolius*. Con lo anterior se lograron obtener correlaciones importantes entre el ácido rosmarínico y la tendencia de las propiedades antioxidantes y presencia de señales que posiblemente corresponden con terpenos de carácter fenólico con la actividad elastasa. En cuanto a la inhibición hialuronidasa a pesar de presentarse bajos niveles de correlación la presencia de derivados de ácidos hidroxicinámicos puede concluirse como fundamental para la inhibición de la enzima hialuronidasa.

El estudio integrado desarrollado en este trabajo de investigación basado en la selección de blancos relacionados con aspectos mecanísticos importantes durante el proceso del envejecimiento acelerado por la radiación UV, caracterización química y análisis multivariado permitió determinar la potencialidad de algunas especies de plantas aromáticas y medicinales como ingredientes naturales de interés para la industria cosmética, concretamente para el desarrollo de productos anti-envejecimiento resaltando extractos de las especies *Rosmarinus oficinales*, *Thymus vulgaris* y *Smalanthus sonchifolius* como potenciales protectores de los daños causados a la ECM por efecto de la radiación UVB, generando además una estrategia integrada aplicable a otras especies vegetales inclusive con otros blancos biológicos.

La investigación química y biológica en torno a ingredientes naturales de nuestra biodiversidad, hace posible el incremento del valor agregado de especies cultivadas y silvestres, beneficiando (quizás en un mediano plazo) no solo a las industrias cosméticas en su búsqueda de productos innovadores y sustentables, sino también a los actores de la cadena de PAMCyA, especialmente a los agricultores y productores. Estas actividades pretenden el fortalecimiento de una cadena productiva con mayor rentabilidad y competitividad.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Rittié, L. & Fisher, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **1**, 705–20 (2002).
2. Mukherjee, P. K., Bahadur, S., Chaudhary, S. K., Harwansh, R. K. & Nema, N. K. *Validation of Medicinal Herbs for Skin Aging. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800874-4.00005-2
3. Khavkin, J. & Ellis, D. a F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* **19**, 229–234 (2011).
4. Thring, T., Hili, P. & Naughton, D. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **11**, 1–11 (2009).
5. Gragnani, A. *et al.* Review of Major Theories of Skin Aging. *Adv. Aging Res.* **03**, 265–284 (2014).
6. Krutmann, J. & Gilchrest, B. A. in *Skin Aging* 33–42 (2006).
7. Scharffetter–Kochanek, K. *et al.* Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* **35**, 307–316 (2000).
8. Mukherjee, P. K., Maity, N., Nema, N. K. & Sarkar, B. K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine* **19**, 64–73 (2011).
9. Yaar, M. & Gilchrest, B. a. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol.* **157**, 874–87 (2007).
10. Burke, K. E. *Prevention and Treatment of Aging Skin with Topical Antioxidants. Skin Aging Handbook* (William Andrew Inc., 2009). doi:10.1016/B978-0-8155-1584-5.50012-0

11. International, E. the future of skin care:game-changing trends and influencers. (2015). at <<http://www.euromonitor.com/the-future-of-skin-care-game-changing-trends-and-influencers/report>>
12. Łopaciuk, A. & Łoboda, M. Global Beauty Industry Trends in the 21st Century. *Knowl. Manag. Innov. Knowl. Learn.* 1079–1087 (2013). at <<http://www.toknowpress.net/ISBN/978-961-6914-02-4/papers/ML13-365.pdf>>
13. Transparency market research. Anti-aging Market is estimated to be worth USD 191.7 Billion Globally by 2019: Transparency Market Research. *Mayo 21* (2015). at <<https://globenewswire.com/news-release/2015/05/21/737992/10135534/en/Anti-aging-Market-is-estimated-to-be-worth-USD-191-7-Billion-Globally-by-2019-Transparency-Market-Research.html>>
14. CBI Ministry of Foreign Affairs. *CBI Tradewatch for Natural Ingredients for Cosmetics*. (2012). at <www.cbu.eu/disclaimer>
15. Antignac, E., Nohynek, G. J., Re, T., Clouzeau, J. & Toutain, H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 324–41 (2011).
16. Nichols, J. a. & Katiyar, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* **302**, 71–83 (2010).
17. Ndlovu, G., Fouche, G., Tselanyane, M., Cordier, W. & Steenkamp, V. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**, 304 (2013).
18. Epstein, H. Cosmeceuticals and polyphenols. *Clin. Dermatol.* **27**, 475–8 (2009).
19. Anitha, T. Medicinal plants used in skin protection. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **5**, 40–43 (2012).

20. Inatani, R., Nakatani, N. & Fuwa, H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 521–528 (1983).
21. Miura, K., Kikuzaki, H. & Nakatani, N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1845–51 (2002).
22. Porte, A. & Godoy, R. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (Thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state, Brazil. *J. Serbian Chem. Soc.* **73**, 307–310 (2008).
23. Grgesina, D., Mandić, M. & Karuza, L. Chemical composition of different parts of *Matricaria chamomilla*. *Food Technol. ...* **33**, 111–113 (1995).
24. Bakó, E., Deli, J. & Tóth, G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J. Biochem. Biophys. Methods* **53**, 241–50 (2002).
25. Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K. & Ulrichová, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *J. Chromatogr. A* **1016**, 89–98 (2003).
26. Park, M. *et al.* Carnosic acid, a phenolic diterpene from rosemary, prevents UV-induced expression of matrix metalloproteinases in human skin fibroblasts and keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **22**, 336–341 (2013).
27. Calò, R., Visone, C. M. & Marabini, L. Thymol and *Thymus Vulgaris* L. activity against UVA- and UVB-induced damage in NCTC 2544 cell line. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **791**, 30–37 (2015).
28. Martin, R. *et al.* Photoprotective effect of a water-soluble extract of *Rosmarinus officinalis* L. against UV-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and reconstructed skin. *Eur. J. Dermatology* **18**, 128–135 (2008).

29. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. *Oportunidades de mercado y tendencias en el desarrollo de productos a partir de las plantas aromáticas, medicinales y condimentarías*. (2014).
30. Celleno, L. & Tamburi, F. in *Nutritional Cosmetics, Beauty from Within* 4–22 (2009). at <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780815520290>>
31. Page, P. M., Sensation, I. & Protection, L. 2 The function and structure of the skin. 10–33
32. SamayaMoments. Radiofrecuencia. *Radiofrecuencia* at <<http://samayamoments.com/aparatologia/radiofrecuencia/>>
33. Naylor, E. C., Watson, R. E. B. & Sherratt, M. J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* **69**, 249–56 (2011).
34. Thiers, B. H., Maize, J. C., Spicer, S. S. & Cantor, A. B. The effect of aging and chronic sun exposure on human Langerhans cell populations. *The Journal of investigative dermatology* **82**, 223–6 (1984).
35. Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatology* **12**, 390–401 (2002).
36. Bailey, a J., Paul, R. G. & Knott, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing Dev.* **106**, 1–56 (1998).
37. Zaghr, D., Waller, J. M. & Maibach, H. I. The effects of aging on skin. *Nutr. Cosmet. - Beauty from Within.* **9**, 25–35 (2009).
38. Krieg, T. & Aumailley, M. The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. *Exp. Dermatol.* **20**, 689–695 (2011).
39. Weiss, A. S. The Science of Elastin. 1–8 (2010).
40. Hunter, J. A. A., Savin, J. A. & Dal, M. . in *clinical dermatology* 7–29 (2002).

41. Castrillón Rivera, L. E., Palma Ramos, A. & Padilla Desgarenes, C. La función inmunológica de la piel. *Dermatologia Rev. Mex.* **52**, 211–224 (2008).
42. Sahu, R. K., Roy, A., Matlam, M., Deshmukh, Vinay Kumar; Dwivedi, J. & Jha, A. K. review on skin aging and compilation of scientific validated medicinal plants prominence to flourish a better research.pdf. *Res. J. Med. plant* **1**, 1–22 (2013).
43. Makrantonaki, E. & Zouboulis, C. C. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1119**, 40–50 (2007).
44. Poljšak, B., Dahmane, R. G. & Godić, A. Intrinsic skin aging : The role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerol* **21**, 33–36 (2012).
45. Krutmann, J. *Premature Aging of Skin from Environmental Assaults. Nutritional Cosmetics* (Elsevier Inc., 2009). doi:10.1016/B978-0-8155-2029-0.50011-9
46. Holtz, R. W. In Vitro Methods to Screen Materials for Anti-aging Effects. *Ski. Aging Handb.* 329–362 (2009). doi:10.1016/B978-0-8155-1584-5.50017-X
47. Xu, H. *et al.* Ultraviolet B-induced apoptosis of human skin fibroblasts involves activation of caspase-8 and -3 with increased expression of vimentin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **26**, 198–204 (2010).
48. Jurkiewicz, B. A. & Buettner, G. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem. Photobiol.* **56**, 1–4 (1994).
49. Jenkins, G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 801–10 (2002).
50. Quan, T., He, T., Voorhees, J. J. & Fisher, G. J. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **280**, 8079–85 (2005).

51. Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J. J. & Fisher, G. J. Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am. J. Pathol.* **165**, 741–51 (2004).
52. Quan, T. *et al.* Elevated cysteine-rich 61 mediates aberrant collagen homeostasis in chronologically aged and photoaged human skin. *Am. J. Pathol.* **169**, 482–90 (2006).
53. Angel, P., Szabowski, a & Schorpp-Kistner, M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* **20**, 2413–2423 (2001).
54. Kang, S., Fisher, G. & Voorhees, J. J. Photoaging: pathogenesis, prevention, and treatment. *Clin. Geriatr. Med.* **17**, 643–659 (2001).
55. Bravo, K. E. PROPIEDADES DE FRUTAS DE ESPECIES ANDINAS SOBRE BLANCOS ANTIENVEJECIMIENTO. (Universidad de Antioquia, 2015).
56. Quan, T. *et al.* Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **14**, 20–24 (2009).
57. Fisher, G. J. *et al.* Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch. Dermatol.* **138**, (2002).
58. Kim, M.-S., Kim, Y. K., Cho, K. H. & Chung, J. H. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 875–82 (2006).
59. Talwar, H. & Griffiths, C. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 285–290 (1995).
60. Pillai, S., Oresajo, C. & Hayward, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation induced matrix degradation--a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 17–34 (2005).
61. Morganti, P. *Natural Products Work in Multiple Ways. Nutritional Cosmetics* (Elsevier Inc., 2009). doi:10.1016/B978-0-8155-2029-0.50012-0

62. Saewan, N. & Jimtaisong, A. Natural products as photoprotection. *J. Cosmet. Dermatol.* **14**, 47–63 (2015).
63. Ota, M., Yokoyama, M. & Co, S. 3.11 Chemistry of Cosmetics. (2010).
64. Saintemarie, A. & Matic, N. The Race to Outpace : The global natural and organic cosmetics market. in *In- Cosmetics, barcelona* (2015).
65. Ramos-e-Silva, M., Celem, L. R., Ramos-e-Silva, S. & Fucci-da-Costa, A. P. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. *Clin. Dermatol.* **31**, 750–758 (2013).
66. Sonti, S. *et al.* Efficacy of a novel treatment serum in the improvement of photodamaged skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **35**, 156–162 (2013).
67. Zaid, M. A., Afaq, F., Syed, D. N. & Mukhtar, H. *Botanical Antioxidants for Protection Against Damage from Sunlight. Nutritional Cosmetics* (Elsevier Inc., 2009). doi:10.1016/B978-0-8155-2029-0.50015-6
68. Kumar, R. *et al.* Review on skin aging and compilation of scientific validated medicinal plants , Prominence to flourish a better research reconnoiters in herbal cosmetic. *Res. J. Med. plant* **1**, 1–22 (2013).
69. Saija, A. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int. J. Pharm.* **199**, 39–47 (2000).
70. Svobodová, A., Psotová, J. & Walterová, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacká Olomouc, Czechoslovakia* **147**, 137–145 (2003).
71. Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. & Kersch, M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int. J. Cosmet. Sci.* **37**, 455–464 (2015).
72. Lopéz, L. F., Mejia, D., Gómez, J. A. & Albarracín, C. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnologico para la cadena productiva de plantas aromaticas, medicinales, condimentarias y afines con énfasis en ingredientes naturales

- para la industria cosmetica en colombia. *Minist. Agric. y Desarro. Rural* (2009). at <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>>
73. Mier, H. Plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y afines - PAMCyA. *Minist. Agric. y Desarro. Rural* (2014).
 74. Productiva, programa de transformación. Cosmeticos, primer sector favorecido con creacion de consejo empresarial Colombo-coreano. *Cosmeticos, primer sector favorecido con creacion de consejo empresarial Colombo-coreano* (2012).
 75. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. & van Beek, T. a. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* **85**, 231–237 (2004).
 76. Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H. & Khalel, K. I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crops Prod.* **43**, 827–831 (2013).
 77. Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. a. & Jordán, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* **19**, 681–687 (2008).
 78. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. *Definición de la agenda prospectiva de investigación para la cadena productiva de plantas aromaticas, medicinales, condimentarias y afines con énfasis en ingredientes naturales para la industria cosmética en Colombia.* (2008).
 79. Rugeles, L. *et al.* *agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena de hortalizas en colombia.* (2010).
 80. Duque, L., Zapata, C., Otálvaro, F. & Schneider, B. Radical Scavenging Capacity of 2,4-Dihydroxy-9-phenyl-1H-phenalen-1-one: A Functional Group Exclusion Approach. *Org. Lett.* **15**, 2011–2014 (2013).

81. Bravo, K., Sepulveda-Ortega, S., Lara-Guzman, O., Navas-Arboleda, A. a. & Osorio, E. Influence of cultivar and ripening time on bioactive compounds and antioxidant properties in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *J. Sci. Food Agric.* **95**, 1562–1569 (2015).
82. Jimenez, N. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. *Ind. Crops Prod.* **70**, 272–279 (2015).
83. Bravo, K., Alzate, F. & Osorio, E. Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Ind. Crops Prod.* (2016). doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.074
84. Parra, N. Contexto y perspectiva de la red de suministro: Plantas aromáticas en Colombia. *Económicas CUC* **33**, 135 – 156 (2012).
85. Castro Restrepo, D. *et al.* *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales.* (2013).
86. al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M. & Sen, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp. Biol.* **37**, 124–30 (1999).
87. Celiktas, O., Kocabas, E., Bedir, E. & Sukan, F. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **100**, 553–559 (2007).
88. Aglarova, a. M., Zilfikarov, I. N. & Severtseva, O. V. Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) (review). *Pharm. Chem. J.* **42**, 81–86 (2008).
89. Wang, Y. & Tang, H. A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion. *J. Agric. ...* **53**, 191–6 (2005).
90. Ukiya, M., Akihisa, T. & Yasukawa, K. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J. Nat. ...* **72**, 1692–1696 (2006).

91. Muley, B., Khadabadi, S. & Banarase, N. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *Trop. J. ...* **8**, 455–465 (2009).
92. Fonseca, Y. & Catini, C. Protective of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J. Ethnopharmacol.* **127**, 596–601 (2010).
93. Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J. & Kamal-Eldin, A. Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8274–81 (2009).
94. Yan, X. *et al.* Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4711–3 (1999).
95. Valentová, K. *et al.* The biological and chemical variability of yacon. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1347–52 (2006).
96. Paye, M., Barel, A. O. & Maibach, H. I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology. Handbook of Cosmetic Science and Technology* (2009). doi:10.1001/archderm.138.9.1262-a
97. Campos, D. *et al.* Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chem.* **135**, 1592–1599 (2012).
98. Lachman, J., Fernández, E. C. & Orsák, M. Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use - A review. *Plant, Soil Environ.* **49**, 283–290 (2003).
99. Shalaby, E. a & Shanab, S. M. M. Antioxidant compounds , assays of determination and mode of action. *African J. Pharm. Phamacology* **7**, 528–539 (2013).
100. Huang, D., Ou, B. & Prior, R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856 (2005).

101. Gelse, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1531–1546 (2003).
102. Sivamani, P., Singaravelu, G., Thiagarajan, V., Jayalakshmi, T. & Kumar, G. R. Comparative molecular docking analysis of essential oil constituents as elastase inhibitors. *Bioinformation* **8**, 457–460 (2012).
103. Baylac, S. & Racine, P. Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. *Int. J. Aromather.* **14**, 179–182 (2004).
104. Menon, G. K., Dryer, L. & Kalafsky, R. *Skin Aging Handbook. Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development* (Elsevier, 2009). doi:10.1016/B978-0-8155-1584-5.50015-6
105. Satardekar, K. V & Deodhar, M. A. Anti-Ageing Ability of Terminalia Species with Special Reference to Hyaluronidase , Elastase Inhibition and Collagen Synthesis In Vitro . **2**, 30–34 (2010).
106. Akhtar, N. *et al.* Evaluation of various functional skin parameters using a topical cream of Calendula officinalis extract. *African J. Pharm. Pharmacol.* **5**, 218–225 (2016).
107. Garbossa, W. A. C. & Maia Campos, P. M. B. G. Euterpe oleracea, Matricaria chamomilla, and Camellia sinensis as promising ingredients for development of skin care formulations. *Ind. Crops Prod.* **83**, 1–10 (2016).
108. Cronin, H. & Draelos, Z. D. Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams. *J. Cosmet. Dermatol.* **9**, 218–225 (2010).
109. Tistaert, C., Dejaegher, B. & Heyden, Y. Vander. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Anal. Chim. Acta* **690**, 148–161 (2011).

110. Chiang, H.-M. *et al.* Coffea arabica extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 309–18 (2011).
111. Naderi, L. *et al.* Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**, 41–51 (2001).
112. Adil, M. D. *et al.* Effect of Emblica officinalis (fruit) against UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **132**, 109–14 (2010).
113. Hong, Y. F. *et al.* Lipoteichoic acid isolated from Lactobacillus plantarum down-regulates UV-induced MMP-1 expression and up-regulates type I procollagen through the inhibition of reactive oxygen species generation. *Mol. Immunol.* **67**, 248–255 (2015).
114. Tominaga, H. *et al.* A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 47–50 (1999). doi:10.1039/A809656B
115. Balasaraswathy, P., Kumar, U., Srinivas, C. & Shashidharan, N. UVA and UVB in sunlight, Optimal Utilization of UV rays in sunlight for phototherapy. *Indian J. Dermatology Venerol. Leprol.* **68**, 198–201 (2002).
116. Hwang, E. *et al.* A comparative study of baby immature and adult shoots of Aloe vera on UVB-induced skin photoaging in vitro. *Phytother. Res.* **27**, 1874–82 (2013).
117. Fisher, G., Datta, S., Talwar, H. & Wang, Z. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Lett. to Nat.* **379**, 335–339 (1996).
118. Fujii, T., Wakaizumi, M., Ikami, T. & Saito, M. Amla (Emblica officinalis Gaertn.) extract promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **119**, 53–7 (2008).
119. Chiang, H. M., Chen, H. C., Lin, T. J., Shih, I. C. & Wen, K. C. Michelia alba extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 4260–4269 (2012).

120. Adil, M. D. *et al.* Effect of *Embllica officinalis* (fruit) against UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **132**, 109–114 (2010).
121. Kim, M.-S., Kim, Y. K., Cho, K. H. & Chung, J. H. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 875–82 (2006).
122. CosIng. *Data base* (2016). at <<http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>>
123. Kvalheim, O. M. *et al.* Chromatographic profiling and multivariate analysis for screening and quantifying the contributions from individual components to the bioactive signature in natural products. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **107**, 98–105 (2011).
124. Chang, Y. X. *et al.* The antioxidant-activity-integrated fingerprint: An advantageous tool for the evaluation of quality of herbal medicines. *J. Chromatogr. A* **1208**, 76–82 (2008).
125. Tistaert, C., Dejaegher, B. & Heyden, Y. Vander. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Anal. Chim. Acta* **690**, 148–161 (2011).
126. Wolfender, J.-L., Marti, G., Thomas, A. & Bertrand, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *J. Chromatogr. A* **1382**, 136–164 (2015).
127. Ong, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **812**, 23–33 (2004).
128. Akowuah, G. a., Ismail, Z., Norhayati, I. & Sadikun, a. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem.* **93**, 311–317 (2005).

129. Alasbahi, R. The In Vitro Inhibition of Human Neutrophil Elastase Activity by some Yemeni Medicinal Plants. *Sci. Pharm.* **76**, 471–484 (2008).
130. Nicolai, M. *et al.* Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement* **89**, 328–332 (2016).
131. Fang, N., Yu, S. & Prior, R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3579–3585 (2002).
132. Cavero, S. *et al.* In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 478–486 (2005).
133. Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M. & Cavrini, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 691–700 (2002).
134. Guillen, M. & Manzanos, M. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chem.* **63**, 373–383 (1998).
135. Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Reza-Gohari, A. & Hamedani-Pirali, M. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn. magazine* **8**, 37–41 (2012).
136. Saija, A. *et al.* Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 476–480 (1999).
137. Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G. & Oreopoulou, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* **12**, 593–606 (2007).
138. Kowalski, R. & Wolski, T. ELECTRONIC OF POLISH AGRICULTURAL Volume 6 Issue 1 Series FOOD SCIENCE TECHNOLOGICAL VALUE OF A SPELT AND. *Electronic J. polish Agric. Univ.* **6**, 13–18 (2003).
139. Valentova, K., Cvak, L., Muck, A., Ulrichova, J. & Simanek, V. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *Eur. J. Nutr.* **42**, 61–6 (2003).

140. L. Eriksson, E. A. in *Technometrics* **45**, 362–362 (2013).
141. Nicolai, M. *et al.* Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement* **89**, 328–332 (2016).