

**Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería**

**Producción y caracterización de un complejo
multifuncional para uso cosmético a partir de
Chenopodium quinoa, *Avena sativa* y *Calendula
officinalis*.**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología.

Luciana Guichón – 229009, Oriana Rodao - 210035

Tutoras: Lic. Josefina Louge, PhD. Mariana Umpierrez

2024

Declaración de autoría

Nosotras, Luciana Guichón y Oriana Rodao, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotras;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Luciana Guichón



Oriana Rodao

12 de Agosto de 2024

Agradecimientos

A nuestras tutoras, Josefina Louge y Mariana Umpierrez, por su apoyo y dedicación durante todo este proyecto, compartieron con nosotras sus conocimientos, nos ayudaron a crecer tanto académica como personalmente, nos motivaron cuando nos encontrábamos frustradas, nos dieron consejos y apoyaron a continuar cuando todo parecía insostenible.

A Cristian, quien fue parte de nuestro equipo durante un período significativo. Su dedicación y buena onda siempre hicieron la diferencia, aportando una energía positiva y un compromiso constante en cada etapa del proyecto. Gracias por formar parte de este proceso.

A todos los funcionarios del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT, que nos dieron una mano cada vez que necesitábamos algo, con amabilidad y generosidad. También a las amistades que formamos a lo largo de la carrera, con quienes compartimos largas mañanas de estudio y buenos momentos, que entienden más que nadie lo que es transitar este proceso y fueron un gran apoyo tanto en los buenos como malos momentos.

Por último, agradecer especialmente a nuestras familias, por su amor y apoyo incondicional, su confianza y su aliento constante han sido una fuente de fortaleza en cada etapa de la carrera. También a nuestros amigos y parejas, quienes han sido un sostén invaluable, haciendo que este camino sea mucho más llevadero.

Nuevamente gracias a todos ustedes, sin su apoyo, este logro no habría sido posible.

Resumen

La biocosmética es una rama de la cosmética que busca soluciones más sostenibles y saludables en comparación con la cosmética tradicional, se centra en mitigar los problemas asociados con los ingredientes químicos y la gestión ineficiente de recursos, impulsando así la creación de formulaciones sustentables.

El objetivo del presente estudio radica en desarrollar un ingrediente cosmético en base a plantas que sea natural y tenga una producción sostenible y sustentable con el medio ambiente.

Las plantas estudiadas, *Avena sativa* (avena), *Chenopodium quinoa* (quinoa) y *Caléndula officinalis* (caléndula) se destacan por su alto contenido en compuestos bioactivos, como polifenoles, saponinas, flavonoides, vitaminas y triterpenos.

La estrategia para generar un ingrediente multifuncional enriquecido con las moléculas previamente mencionadas se basó en su extracción de las plantas avena, quinoa y caléndula. Se implementaron cuatro métodos de extracción usando diferentes combinaciones de solventes, como agua, glicerol y etanol, bajo diversas condiciones de incubación en términos de tiempo y temperatura.

Las muestras obtenidas fueron sometidas a un análisis exhaustivo utilizando diversas técnicas, lo que permitió formular el ingrediente M1, compuesto por un 50% de extracto de caléndula, 30% de quinoa y 20% de avena. Se realizaron pruebas afrosimétricas para evaluar cualitativamente la presencia de saponinas, y mediante barridos espectrales se identificaron posibles moléculas bioactivas. En la cuantificación de saponinas se observó un resultado de 4,6 mg EE/mL. Además, se evaluó la capacidad emulsionante del extracto, observándose la formación de macroemulsiones.

El análisis de la actividad antimicrobiana reveló eficacia contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. La cuantificación de polifenoles resultó en 140 mg EAG/mL, la actividad antioxidante fue de 280.000 µg EAA/mL y se liofilizó un 74% del extracto.

También se realizaron ensayos de citotoxicidad en líneas celulares no tumorales y se evaluó el efecto fotoprotector del extracto frente a la exposición a UV, se determinó que al 1% no afecta la viabilidad celular y presenta efecto fotoprotector. El ensayo de zimograma mostró que el extracto no afecta la actividad de metaloproteasas.

Los resultados obtenidos en este estudio no solo destacan el potencial de la avena, la quinoa y la caléndula como ingredientes claves en la formulación de biocosméticos sostenibles, sino que también abren nuevas vías para la creación de productos que promuevan la salud y el bienestar de manera natural, respaldados por una producción respetuosa con el medio ambiente.

Palabras clave

Biocosmética; avena; quinoa; caléndula; extractos naturales; glicerina; saponinas; polifenoles; actividad antioxidante; emulsionantes; actividad antimicrobiana.

Abreviaturas

| | |
|-------|---|
| %m/v | porcentaje masa/volumen; |
| %v/v | porcentaje volumen/volumen; |
| °C | grados Celsius; |
| ABTS | ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico); |
| ADN | ácido desoxirribonucleico; |
| AE72 | muestra de avena extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente; |
| AG4 | Extracción de avena con agua y glicerol por 4 horas a 45 °C; |
| AG72 | Muestra de avena extraída con agua y glicerina por 72 horas a temperatura ambiente; |
| AGE4 | muestra de avena extraída con agua, glicerina y etanol, por 4 horas a 45 °C; |
| AGE72 | muestra de avena extraída con agua, glicerina y etanol por 72 horas a temperatura ambiente; |
| ATCC | Colección Americana de Cultivos Tipo, del inglés <i>American Type Culture Collection</i> ; |
| CAGR | tasa compuesta anual, del inglés <i>Compound Annual Growth Rate</i> ; |
| CE72 | muestra de caléndula extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente; |
| cm | centímetros; |
| DLS | dispersión dinámica de luz, del inglés <i>Dynamic Light Scattering</i> ; |

| | |
|-----------|---|
| DMEM | medio Eagle modificado por Dulbecco, del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ; |
| DMSO | dimetilsulfóxido; |
| EC50 | mitad de la concentración efectiva máxima, del inglés <i>Half maximal effective concentration</i> ; |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético; |
| FDA | Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés <i>Food and Drug Administration</i> ; |
| FDEH | ftalato de di(2-etilhexilo); |
| FDIN | ftalato de diisononilo; |
| GAE | equivalentes de ácido gálico; |
| kDa | kilodalton; |
| kW | kilowatt; |
| LB | caldo de lisogenia; |
| M | molar; |
| M1 | Muestra 1, 50% extracto CE72, 30% extracto QG72, 20% extracto AGE72; |
| M2 | Muestra 2, 30% extracto CE72, 50% extracto QG72, 20% extracto AGE72; |
| mg | miligramo; |
| mg EAG/mL | miligramos de equivalentes de ácido gálico por mililitro; |
| mg EE/mL | miligramos de equivalentes de escina por mililitro; |

| | |
|-------|--|
| mg/mL | miligramo por mililitro; |
| mL | mililitro; |
| mM | milimolar; |
| MMP-2 | metaloproteasa 2; |
| MMP-9 | metaloproteasa 9; |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; |
| nm | nanómetro; |
| OD | densidad óptica; |
| OD600 | densidad óptica a 600 nm; |
| PBS | buffer fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> ; |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; |
| QE72 | muestra de quinoa extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente; |
| QG4 | muestra de quinoa extraída con glicerina y agua por 4 horas a 45 °C; |
| QG72 | muestra de quinoa extraída con agua y glicerina por 72 horas a temperatura ambiente; |
| QGE4 | muestra de quinoa extraída con agua, glicerina y etanol, por 4 horas a 45 °C; |
| QGE72 | muestra de quinoa extraída con agua, glicerina y etanol por 72 horas a temperatura ambiente; |
| ROS | especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i> ; |

| | |
|----------------------|---|
| rpm | revoluciones por minuto; |
| SFB | suero fetal bovino; |
| μL | microlitro; |
| USP | Farmacopea de Estados Unidos, del inglés <i>United States Pharmacopeia</i> ; |
| UV | ultravioleta; |
| V | voltios; |
| xg | fuerza centrífuga; |
| YPD | medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa, del inglés <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> ; |
| μg | microgramo; |
| $\mu\text{g EAA/mL}$ | microgramos de equivalentes de ácido ascórbico por mililitro; |
| $\mu\text{g/mL}$ | microgramo por mililitro; |
| μm | micrómetro; |

Índice de Contenido

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Introducción..... | 14 |
| 1.1. | Biocosmética | 14 |
| 1.2. | Ingredientes fundamentales para un producto eficiente | 15 |
| 1.2.1. | Solventes verdes | 15 |
| 1.2.2. | Conservantes..... | 16 |
| 1.2.3. | Emulsionantes..... | 17 |
| 1.2.4. | Antioxidantes..... | 18 |
| 1.3. | Plantas con ingredientes potenciales para el producto | 19 |
| 1.3.1. | <i>Avena sativa</i> | 19 |
| 1.3.2. | <i>Caléndula officinalis</i> | 19 |
| 1.3.3. | <i>Chenopodium quinoa</i> | 20 |
| 1.4. | Compuestos bioactivos destacados en las plantas seleccionadas | 21 |
| 1.4.1. | Saponinas..... | 21 |
| 1.4.2. | Polifenoles | 22 |
| 2. | Objetivo general | 24 |
| 2.1. | Objetivos específicos..... | 24 |
| 3. | Metodología..... | 25 |
| 3.1. | Generación de extractos..... | 25 |
| 3.2. | Caracterización de los extractos generados | 26 |
| 3.2.1. | Test Afrosimétrico de espuma..... | 26 |
| 3.2.2. | Barridos espectrales | 26 |
| 3.2.3. | Cuantificación de saponinas | 27 |
| 3.2.4. | Cuantificación de polifenoles | 27 |
| 3.2.5. | Cuantificación de la actividad antioxidante | 28 |
| 3.2.6. | Determinación de la actividad antimicrobiana | 29 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3.2.6.1. | Evaluación de la actividad antimicrobiana en cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en matraces | 29 |
| 3.2.6.2. | Evaluación de la actividad antimicrobiana en cultivo líquido de <i>Candida albicans</i> en placa..... | 29 |
| 3.2.7. | Generación de liofilizado..... | 30 |
| 3.2.8. | Determinación de la capacidad emulsionante | 30 |
| 3.2.9. | Cultivos celulares | 31 |
| 3.2.9.1. | Líneas celulares | 31 |
| 3.2.9.2. | Descongelado celular..... | 32 |
| 3.2.9.3. | Criopreservación celular..... | 32 |
| 3.2.10. | Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares no tumorales..... | 33 |
| 3.2.11. | Evaluación de la capacidad fotoprotectora frente a exposición UV..... | 34 |
| 3.2.12. | Evaluación del efecto modulador de actividad de metaloproteasas de los extractos mediante ensayo de Zimograma..... | 35 |
| 3.2.12.1. | SDS-PAGE | 36 |
| 4. | Resultados y discusión | 38 |
| 4.1. | Generación de extractos..... | 38 |
| 4.2. | Test Afrosimétrico de espuma..... | 38 |
| 4.3. | Barridos Espectrales | 40 |
| 4.4. | Cuantificación de saponinas | 43 |
| 4.5. | Determinación de las mejores muestras por condiciones de extracción | 45 |
| 4.6. | Cuantificación de saponinas de las mejores mezclas | 46 |
| 4.7. | Cuantificación de polifenoles | 47 |
| 4.8. | Cuantificación de la actividad antioxidante | 49 |
| 4.9. | Determinación de la actividad antimicrobiana | 52 |
| 4.10. | Generación de liofilizado..... | 56 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.11. | Selección y optimización de la formulación en base a los parámetros estudiados | 56 |
| 4.12. | Determinación de la capacidad emulsionante | 56 |
| 4.13. | Evaluación del efecto modulador de actividad de metaloproteasas de los extractos mediante ensayo de Zimograma..... | 59 |
| 4.14. | Cultivos Celulares | 64 |
| 4.15. | Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares no tumorales..... | 65 |
| 4.16. | Evaluación de la capacidad fotoprotectora frente a exposición UV..... | 69 |
| 5. | Conclusiones..... | 74 |
| 6. | Referencias bibliográficas | 75 |
| 7. | Anexo | 85 |
| 7.1. | Anexo 1 | 85 |
| 7.2. | Anexo 2 | 86 |
| 7.3. | Anexo 3 | 88 |
| 7.4. | Anexo 4 | 89 |
| 7.5. | Anexo 5 | 90 |

1. Introducción

1.1. Biocosmética

La biocosmética, también conocida como cosmética natural o ecológica, es una rama de la cosmética que se centra en el uso de ingredientes naturales y orgánicos en la formulación de productos para el cuidado personal. Estos productos están diseñados para ser amigables con el medio ambiente y la salud, evitando el uso de químicos sintéticos, conservantes artificiales y otros aditivos potencialmente dañinos. Ha ganado popularidad debido a una creciente preocupación por el impacto ambiental y los posibles efectos adversos de los ingredientes sintéticos en la piel y la salud en general. [1]

Los productos de biocosmética utilizan ingredientes derivados de plantas, minerales y otros recursos naturales. Los ingredientes orgánicos provienen de cultivos que no utilizan pesticidas ni fertilizantes sintéticos, garantizando su pureza y calidad. [1]

Se promueven prácticas agrícolas y de manufactura sostenibles, esto incluye el uso de métodos de cultivo ecológicos, embalajes reciclables o biodegradables y procesos de producción que minimizan el impacto ambiental. [2]

Evita el uso de ingredientes que pueden ser irritantes o dañinos para la piel, como parabenos, sulfatos y fragancias sintéticas. En su lugar, se emplean conservantes naturales y aceites esenciales, que no solo son seguros, sino que también aportan beneficios adicionales para la piel. [2]

Un estudio realizado por Statista y Grand View Research, determinó que en 2024 el mercado mundial generó ingresos de USD 13,87 mil millones y se espera que crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 6,1% entre 2024 y 2030. [3] [4]

En Uruguay la comercialización de ingredientes biocosméticos está regulada por el Ministerio de Salud Pública (MSP) a través de su División de Productos Cosméticos. Uruguay sigue las normativas establecidas por el MERCOSUR para productos cosméticos, que establece una lista de ingredientes permitidos y prohibidos; las plantas utilizadas en este trabajo no se encuentran en dicha lista. La resolución GMC N°110/94

regulan la seguridad y el etiquetado de cosméticos, que también aplica a biocosméticos. [5]

Por otro lado, a nivel mundial la FDA ha aprobado productos basados en extractos de avena y caléndula, lo que respalda la seguridad de su uso; a su vez ambas plantas son de fácil acceso en la región ya que se cultivan a nivel local. La quinoa no está específicamente aprobada por la FDA como un ingrediente activo, pero su uso en la industria está en continuo aumento gracias a sus propiedades beneficiosas, en este caso las empresas deben asegurarse de que los productos que la contienen sean seguros y cumplan con las normativas generales de la FDA en términos de calidad, etiquetado y fabricación. [6]

1.2. Ingredientes fundamentales para un producto eficiente

1.2.1. Solventes verdes

El concepto de "solventes verdes" se ha popularizado en la industria química y en la investigación debido al aumento en la conciencia ambiental en la población a nivel mundial. Esto ha generado una demanda creciente de procesos industriales que reduzcan el impacto en el medio ambiente y que promuevan prácticas más sostenibles. Los solventes verdes son aquellos que, en comparación con los solventes tradicionales, ofrecen un menor riesgo para la salud humana y el medio ambiente, manteniendo la eficacia necesaria que les permita cumplir con los requisitos técnicos y de calidad en diversas aplicaciones. [7]

Una de las principales razones que impulsó el desarrollo de solventes verdes es la necesidad de minimizar el uso de solventes orgánicos volátiles, que son conocidos por contribuir a la contaminación del aire y generar problemas de salud como la irritación respiratoria y el cáncer. Algunos ejemplos de solventes verdes incluyen el agua, los líquidos iónicos, los alcoholes ligeros como el etanol, y los éteres de polietilenglicol. El agua, a pesar de ser el solvente más benigno, no siempre es adecuada para todas las aplicaciones, por lo que se han desarrollado alternativas innovadoras que incluyen líquidos iónicos, que son sales en estado líquido a temperatura ambiente y que pueden disolverse una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos. [7]

La glicerina es una sustancia natural económica, no tóxica y un subproducto importante de la industria del biodiesel. El mercado del mismo está en constante expansión y ha incrementado significativamente la producción de glicerina, bajando el precio al mismo tiempo. Así, la glicerina se ha convertido en un líquido muy accesible y económico que puede utilizarse como nuevo solvente con alto potencial para la extracción de polifenoles bioactivos. [7]

1.2.2. Conservantes

Los conservantes son elementos esenciales en productos como alimentos, fármacos y artículos de higiene personal para prevenir la alteración causada por microorganismos o cambios químicos no deseados. Su presencia es crucial para evitar el deterioro y proteger contra la contaminación durante el uso. Estos pueden ser antimicrobianos para evitar el crecimiento de microorganismos o antioxidantes para proteger contra la degradación por exposición al oxígeno. [8]

La carencia de conservantes en productos cosméticos y alimenticios puede propiciar la contaminación, conduciendo a la descomposición del producto y potencialmente ocasionando irritaciones o infecciones. La contaminación microbiana de productos, especialmente aquellos aplicados alrededor de los ojos y en la piel, puede generar problemas a nivel de salud. [8]

En la mayoría de los casos, los ingredientes conservantes se emplean con el propósito de resguardar el producto y el consumidor, garantizando su seguridad y asegurando su funcionamiento durante toda su vida útil. Los parabenos, conservantes comunes en cosméticos, son compuestos que previenen el crecimiento de microorganismos y actúan como antioxidantes. Aunque inicialmente eran considerados seguros, el metilparabeno y etilparabeno han sido clasificados como posibles disruptores endocrinos, con estudios que sugieren actividad estrogénica y riesgo de cáncer, aunque sin pruebas concluyentes. Además, se han detectado parabenos en cuerpos de agua, suelos, aire, y fluidos corporales humanos, lo que plantea preocupaciones sobre su seguridad y el impacto ambiental, requiriendo más investigación. [8]

Por lo mencionado anteriormente, la industria cosmética se encuentra en una constante búsqueda de conservantes que sean sostenibles y sustentables tanto para el medio ambiente como para la salud.

1.2.3. Emulsionantes

Una emulsión es una mezcla de dos fases líquidas inmiscibles estabilizada por un emulsionante. Ejemplificado por la mezcla de aceite y agua, las emulsiones tienden a separarse sin un emulsionante que las mantenga unidas. Los emulsionantes son moléculas anfifílicas con una región polar afín al agua y otra lipofílica afín al aceite, lo que les permite estabilizar la emulsión. Estas emulsiones son cruciales en cosmética, ya que permiten la incorporación de ingredientes solubles en agua y aceite en una sola formulación, como agentes hidratantes, extractos vegetales y filtros solares. [9]

En la industria, algunos de los tensioactivos más utilizados como emulsionantes incluyen el lauril éter polietoxilado y el oleil éter polietoxilado, ambos tensioactivos no iónicos que se destacan por su capacidad para formar emulsiones estables al reducir la tensión superficial entre fases acuosas y oleosas. También son comunes el trioleato de sorbitano, utilizado en emulsiones de agua en aceite, y el monoestearato de sorbitano polietoxilado, empleado para mejorar la textura y la homogeneidad en productos cosméticos y alimentarios. Sin embargo, a pesar de su eficacia, estos tensioactivos presentan desventajas por su origen sintético. Su producción a menudo implica procesos químicos que pueden generar subproductos no deseados, y su biodegradabilidad puede ser limitada, lo que plantea preocupaciones ambientales. Además, algunos compuestos sintéticos pueden causar irritación en la piel y ser menos compatibles con formulaciones naturales, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas más sostenibles y naturales en la industria. [9]

Los biotensioactivos son obtenidos a partir de biomasa y fuentes renovables, a diferencia de los tensioactivos sintéticos obtenidos de la industria petroquímica, no obstante, aun conociendo sus ventajas realmente el problema original es la producción, extracción y purificación de los mismos, ya que la biotecnología que se necesita para obtener estos metabolitos secundarios implica un mayor costo de producción que muchas industrias no

están dispuestas a asumir en su totalidad. Así que se destaca que estos biosurfactantes serían utilizados únicamente si tienen un rendimiento igual o superior al de sus homólogos químicos, lo que incluye un precio competitivo en el mercado. [9]

1.2.4. Antioxidantes

A nivel molecular, los antioxidantes actúan como agentes reductores que pueden donar electrones a los radicales libres, estabilizándolos y previniendo el daño oxidativo en las células. Los antioxidantes, como la vitamina C, la vitamina E, y los polifenoles, neutralizan estos radicales, convirtiéndolos en moléculas menos reactivas. Este proceso de neutralización es crucial para proteger las estructuras celulares y mantener la integridad de los tejidos, especialmente en la piel, donde el estrés oxidativo puede acelerar el envejecimiento y contribuir a diversas enfermedades dermatológicas. [10]

En la industria cosmética, el uso de antioxidantes ha ganado popularidad debido a sus propiedades protectoras y regeneradoras. Los antioxidantes se han convertido en ingredientes esenciales en productos cosméticos diseñados para combatir el envejecimiento de la piel, ya que pueden prevenir y reducir la aparición de arrugas, manchas y pérdida de elasticidad. Algunos de los antioxidantes más utilizados en cosmética incluyen la vitamina C, la vitamina E, y el resveratrol, cada uno de los cuales ofrece beneficios específicos para la salud y apariencia de la piel. [11]

Referencias bibliográficas destacan que la eficacia de los antioxidantes en cosmética no solo depende de su capacidad para neutralizar radicales libres, sino también de su estabilidad química y su capacidad para penetrar en las capas más profundas de la piel. Por esta razón, a la hora de formular un producto cosmético es importante seleccionar cuidadosamente los antioxidantes adecuados y las tecnologías de formulación que maximicen su eficacia. Los antioxidantes cumplen un rol esencial en la protección de la piel contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (UV). La exposición prolongada a los rayos UV es una de las principales causas de daño oxidativo en la piel, y los antioxidantes pueden ofrecer una defensa complementaria a los filtros solares tradicionales, reduciendo así el riesgo de fotodaño y fotoenvejecimiento. [12]

1.3. Plantas con ingredientes potenciales para el producto

1.3.1. Avena sativa

La avena (*Avena sativa*) es un cereal que se ha utilizado durante siglos tanto en la alimentación como en la medicina tradicional, que a lo largo de los años ha ganado popularidad en la industria cosmética gracias a sus múltiples beneficios. Los extractos de avena contienen una variedad de compuestos bioactivos, incluyendo avenantramidas, beta-glucanos, y lípidos, que contribuyen a sus propiedades antiinflamatorias y emolientes. [13] [14]

Las avenantramidas, en particular, son un grupo de polifenoles propios de la avena que presentan propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Estas moléculas ayudan a reducir la inflamación cutánea y el estrés oxidativo, que son factores clave en el envejecimiento de la piel y en el desarrollo de condiciones irritantes. [15]

A su vez, los beta-glucanos presentes en la avena tienen la capacidad de formar una película protectora sobre la piel, que ayuda a retener la humedad y mejorar la barrera cutánea. Esto es crucial para mantener la piel hidratada y protegida de agentes externos dañinos. La acción de los beta-glucanos es respaldada por investigaciones que han demostrado su eficacia en la reparación de la barrera epidérmica, lo que resulta en una piel más suave y flexible. Por otro lado, las saponinas provenientes de la avena tienen propiedades tensoactivas que pueden ayudar a crear emulsiones estables cuando se utilizan en una formulación. [15]

Los estudios también sugieren que los productos formulados con avena coloidal, una forma finamente molida de avena, son efectivos en el tratamiento de la piel seca y en la reducción de la necesidad de corticosteroides en algunos pacientes con dermatitis atópica. Este tipo de avena es comúnmente incorporada en lociones, cremas, y baños para aprovechar sus propiedades emolientes y calmantes. [13]

1.3.2. Caléndula officinalis

La caléndula (*Caléndula officinalis*) se destaca por su amplia gama de compuestos activos y notables propiedades terapéuticas, como su acción antiinflamatoria, antiséptica,

cicatrizante y bactericida. A esta planta se le reconocen grandes beneficios en el cuidado de la piel, especialmente para calmar quemaduras, irritaciones cutáneas, picaduras de insectos, manchas, dermatitis, acné, resequedad, entre otros problemas dermatológicos. [16]

Entre sus componentes principales se encuentran los carotenoides y flavonoides (derivados del isoramnetol y quercetol, como la quercetina-3-O-glicósido), junto con saponinas triterpénicas del ácido oleanólico, ácidos fenólicos, esteroides (libres, esterificados y glicosilados), alcaloides, xantofilas, mucílagos, taninos, cumarinas y polisacáridos solubles en agua. [17]

1.3.3. Chenopodium quinoa

La quinoa (*Chenopodium quinoa*) es una planta andina de alto valor nutricional que ha ganado interés en la industria cosmética por sus propiedades beneficiosas para la piel. Esta planta es rica en aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y antioxidantes, que contribuyen a la salud de la piel y son utilizados en productos cosméticos para mejorar la hidratación, elasticidad y reducir los signos del envejecimiento. [18] [19]

Uno de los componentes más valiosos de la misma en cosmética son sus saponinas, estos compuestos tienen propiedades espumantes y limpiadoras, lo que las hace ideales para su uso en productos de limpieza facial y corporal. La quinoa también posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, y a su vez, gracias a las saponinas, extractos de esta pueden generar emulsiones estables. [20]

Además, la quinoa es rica en ácidos grasos esenciales, como el ácido linoleico y el ácido oleico, que son fundamentales para mantener la barrera lipídica de la piel. Estos ácidos grasos ayudan a mejorar la hidratación de la piel y a mantener su elasticidad, lo que puede contribuir a reducir la apariencia de arrugas y líneas finas. Los antioxidantes presentes en la quinoa, como los flavonoides y los polifenoles, también juegan un papel crucial en la protección de la piel contra el daño causado por los radicales libres y la exposición a la radiación UV. A su vez las diferentes saponinas presentes en la quinoa han demostrado poseer actividad antimicrobiana [21] [22]

1.4. Compuestos bioactivos destacados en las plantas seleccionadas

1.4.1. Saponinas

Las saponinas son compuestos glucosilados que se encuentran en una variedad de plantas y que han atraído considerable atención en la cosmética debido a sus propiedades únicas y su estructura molecular distintiva. Estas moléculas están compuestas por una parte aglicona, que puede tener una estructura esteroideal o triterpenoide, y uno o más glucósidos unidos a ella. La estructura glucosídica de las saponinas les confiere sus propiedades tensioactivas, permitiéndoles formar espumas y emulsiones en productos cosméticos. [23]

En cuanto a sus propiedades cosméticas, las saponinas son valoradas principalmente por su capacidad para actuar como tensioactivos suaves, ya que gracias a su estructura molecular pueden formar espumas estables y emulsiones que son útiles en productos de limpieza y cuidado de la piel. Estas propiedades son útiles para mejorar la textura y la eficacia de productos como champús, geles de ducha y limpiadores faciales. [24]

Por otro lado, las saponinas también poseen características antiinflamatorias y antioxidantes. Existe bibliografía que establece que saponinas triterpénicas poseen una alta capacidad de reducir la inflamación en la piel y proteger contra el daño oxidativo. Estas propiedades hacen que las saponinas sean valiosas no solo para la limpieza, sino también para la formulación de productos que buscan calmar y proteger la piel. [24]

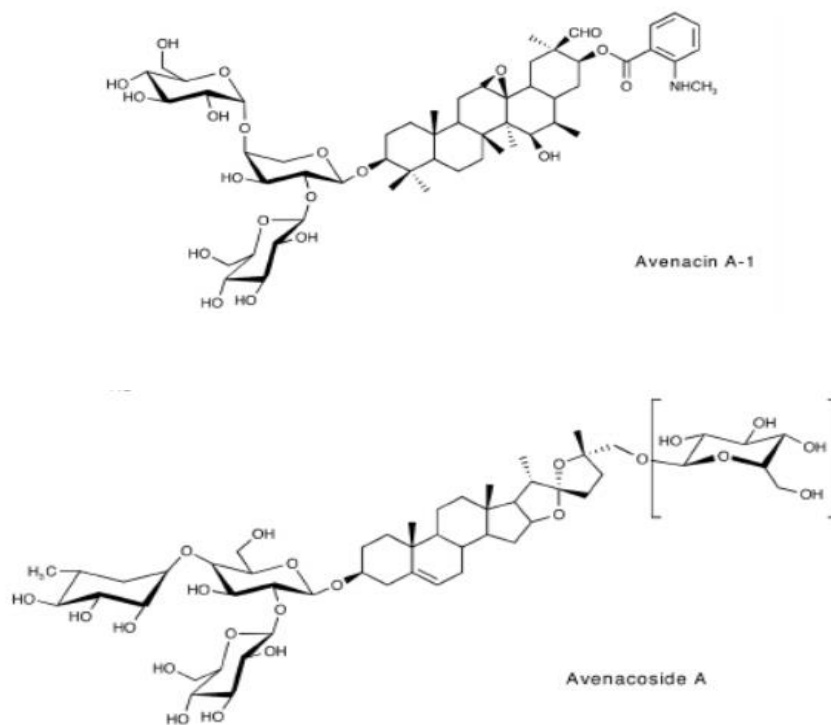


Figura 1. Estructura química de la Avenacin A-1 y Avenacoside A, tipo de saponinas identificadas en *Avena sativa*. Tomada de Bernards et al. (2011)

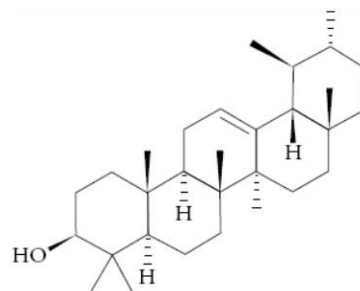


Figura 2. Estructura química de la β -amirina, tipo de saponina identificada en *Chenopodium quinoa*. Tomada de Ahumada et al. (2016)

1.4.2. Polifenoles

Los polifenoles son una amplia y diversa clase de compuestos naturales que se encuentran predominantemente en las plantas. Están caracterizados por la presencia de múltiples grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. Estos desempeñan varias funciones importantes en las plantas, incluyendo la protección contra la radiación ultravioleta y el ataque de patógenos, así como la contribución a la pigmentación de las flores, frutos y

hojas. Además, son responsables de muchas de las propiedades sensoriales de los alimentos vegetales, como el sabor, el color y la astringencia. [25]

Desde una perspectiva química, los polifenoles se pueden clasificar en varias subclases, incluyendo flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos. A su vez, se dividen en subcategorías como flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y catequinas. Cada subclase de polifenoles tiene una estructura química distinta que influye en sus propiedades bioquímicas y biológicas. [26] [27]

Los polifenoles son conocidos por sus propiedades antioxidantes. Actúan como donadores de electrones y pueden neutralizar los radicales libres, que son moléculas altamente reactivas que pueden causar daño celular y contribuir al envejecimiento y al desarrollo de diversas enfermedades crónicas. Además de su actividad antioxidante, los polifenoles también han mostrado propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y cardio protectoras en diversos estudios. [26]

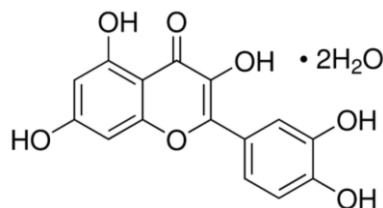


Figura 3. Estructura química de la quercetina, tipo de polifenol identificado en *Caléndula officinalis* y *Chenopodium quinoa*. Tomada de Toscano et al. (2014)

2. Objetivo general

Generar un complejo multifuncional con propiedades conservantes, emulsionantes y estabilizantes para uso biocosmético a partir de extractos de *Chenopodium quinoa*, *Avena sativa* y *Calendula officinalis*.

2.1. Objetivos específicos

- Desarrollar una metodología de extracción de las moléculas bioactivas para las plantas seleccionadas.
- Obtener una formulación con capacidad antimicrobiana, antioxidante y emulsionante.
- Evaluar la citotoxicidad y el efecto fotoprotector frente a la exposición UV en dos líneas celulares eucariotas no tumorales.

3. Metodología

3.1. Generación de extractos

Se puso a punto un protocolo de extracción utilizando diferentes proporciones de glicerol, etanol (proveniente de alcohol de cereales) y agua, evaluando diferentes parámetros como: temperatura, tiempo y sonicación.

Proporciones de solventes evaluadas:

1. Agua: Glicerol en proporciones 50% y 50%.
2. Agua: Etanol en proporciones 50% y 50%.
3. Agua: Etanol: Glicerol en proporciones 50%, 20% y 30%.

Condiciones de tiempo, temperatura y sonicación evaluadas:

1. Incubación durante 4 horas a 45 °C en baño de agua termostatzado.
2. Sonicación en baño de agua por 15 minutos y posterior incubación en agitador orbital durante 72 horas a 25 °C.

Se obtuvieron comercialmente avena, quinoa y caléndula e inicialmente se procedió a generar un polvo. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron las mezclas de solventes mencionadas anteriormente y un 10% m/v del polvo de las plantas, esto fue realizado por triplicado para cada condición.

Pasado el tiempo de incubación se filtraron las muestras utilizando un filtro de papel Whatman y un extractor al vacío. Luego se centrifugaron por 15 minutos a 5.000 rpm para continuar la evaluación del extracto con el sobrenadante.

Nomenclatura de mezclas:

Se denominaron a las muestras teniendo en cuenta la planta a evaluar, la condición de solventes y el tiempo de incubación.

Según la planta a evaluar se utilizaron las iniciales A (avena), C (caléndula) y Q (quinoa), en cuanto al solvente utilizado se denominó G (Agua: Glicerol), E (Agua: Etanol) y GE

(Agua: Etanol: Glicerol), por último, teniendo en cuenta el tiempo de incubación se utilizó el 4 (incubación durante 4 horas) y 72 (incubación durante 72 horas).

Ejemplos:

1. La denominación “AGE72” representa un extracto de avena en Agua: Etanol: Glicerol, sonicación en baño de agua por 15 minutos y posterior incubación en agitador orbital durante 72 horas a 25 °C.
2. La denominación “QG4” representa un extracto de quinoa en Agua: Glicerol incubado durante 4 horas a 45 °C en baño de agua termostaticado.

3.2. Caracterización de los extractos generados

3.2.1. Test Afrosimétrico de espuma

Se realizó un test Afrosimétrico con el objetivo de detectar de manera cualitativa la presencia de saponinas en la muestra, que consiste en evaluar la capacidad de la muestra de generar espuma. Se realizaron diluciones 1 en 3 de todas las muestras en agua destilada, excepto las muestras que se extrajeron con etanol y agua, a las que se les hizo una dilución 1 en 10 para mitigar el efecto de inhibición de la formación de espuma generado por el alcohol. Cada dilución se realizó por triplicado en tubos de ensayo, los cuales se agitaron vigorosamente durante 15 segundos para luego registrar la medida de altura de espuma a tiempo 0, 10, 20 y 30 minutos. Se consideraron resultados positivos cuando luego de transcurridos 10 minutos la altura de la espuma persistente era mayor a 0,2 cm. [28]

3.2.2. Barridos espectrales

Se llevaron a cabo mediciones del espectro de absorción de las muestras en el rango de longitudes de onda de 200 a 750 nm, empleando un espectrofotómetro Shimadzu UVmini 1240 y celdas de cuarzo. Además de las muestras, se midió el espectro de absorción de varios compuestos, como la escina que es una saponina y ácido gálico que es un polifenol, para tener una referencia de los picos de absorción característicos de estos compuestos. Se realizó un blanco con las matrices de extracción para evitar interferencias con otros compuestos que puedan absorber en el mismo rango de longitud de onda.

3.2.3. Cuantificación de saponinas

La cuantificación de saponinas presentes en las muestras se llevó a cabo el método de vainillina-sulfúrico descrito por Le et al. (2018) [29]. Se utilizó escina como saponina estándar, generando curvas de calibración por triplicado utilizando como solvente las mezclas de solventes con las que se extrajeron las muestras, en un rango de 0,2 a 1,8 mg/mL de escina.

Las muestras para analizar se prepararon por triplicado en tubos de ensayo con tapa a rosca. Utilizando una campana de extracción, se añadieron en cada tubo 2,5 mL de ácido sulfúrico al 72% (v/v), 250 μ L de vainillina al 8% (m/v) en etanol, y 250 μ L de muestra. Los tubos se incubaron en un baño termostatzado a 60 °C durante 15 minutos y posteriormente se colocaron 200 μ L de cada muestra en una placa de 96 pocillos. Se midió la absorbancia a 560 nm utilizando un lector de placas Multiskan FC de Thermo Scientific y los resultados obtenidos se analizaron con el software GraphPad Prism 8.0.2. Los puntos de las curvas de calibración se ajustaron a líneas rectas, y en cada una se interpolaron los valores de absorbancia registrados para las muestras correspondientes, expresando los datos como miligramos de EE (equivalentes de escina) por mililitro de muestra.

Se utilizó un fármaco comercial en formato de cápsulas que contenían 50 mg de escina y no se observaron interferencias de los posibles excipientes presentes en las cápsulas.

Se realizaron mezclas denominadas como M1 que se compone por 50% de CE72, 30% QG72 y 20% AGE72 y M2 que se compone por 30% de CE72, 50% QG72 y 20% AGE72.

Las muestras individuales se denominaron AGE72 (extracción de avena con 30% de glicerol, 20% de etanol y 50% de agua), QG72 (extracción de quinoa con 50% de glicerol y 50% de agua) y CE72 (extracción de caléndula con 50% de etanol y 50% de agua), todas extraídas durante 72 horas a temperatura ambiente.

3.2.4. Cuantificación de polifenoles

La cuantificación de polifenoles en las muestras se realizó mediante un ensayo colorimétrico, siguiendo el protocolo de Smolskait et al. (2015), con ligeras

modificaciones aplicando el reactivo de Folin-Ciocalteu [30]. Para diseñar la curva estándar, se utilizó ácido gálico diluido agua en el rango de 0,025 a 0,3125 mg/mL.

Se utilizó una placa de 96 pocillos, colocando en cada pocillo 10 μ L de muestra, 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% (v/v) y 80 μ L de Na₂CO₃ 1 M. Luego, la placa se agitó e incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm utilizando un lector de placas TECAN Infinite M200 PRO. Cada muestra y punto de la curva de calibración se realizaron por triplicados.

Los valores de absorbancia obtenidos se procesaron con el software GraphPad Prism 8.0.2, ajustando a una recta los valores obtenidos para los puntos de la curva de calibración, en la cual se interpolaron los valores de absorbancia de cada muestra, expresando los datos como miligramos de EAG (equivalentes de ácido gálico) por gramo de muestra.

3.2.5. Cuantificación de la actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de las muestras se midió empleando el método del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), siguiendo el protocolo de Miller et al. (1993) con adaptaciones para realizarlo en una placa de 96 pocillos [31]. Se empleó como estándar ácido ascórbico en un rango de concentraciones de 25 a 225 μ g/mL.

Se preparó una solución de 7 mM de ABTS con 2,45 mM de persulfato de amonio en agua para generar la forma radical libre del ABTS e incubó durante 16 horas. Posterior a la incubación, se realizó una dilución en etanol hasta obtener una absorbancia de $0,7 \pm 0,025$ a 734 nm, medida en el espectrofotómetro Shimadzu UVmini 1240 y empleando celdas de cuarzo. Se utilizó una placa de 96 pocillos, añadiendo 3 μ L de muestra y 300 μ L de ABTS en forma de radical libre, realizado por triplicado. Se incubó durante 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 734 nm del producto coloreado utilizando un lector de placas TECAN Infinite M200 PRO. El ensayo fue repetido 5 veces.

Los resultados obtenidos se procesaron con el software GraphPad Prism 8.0.2. Los valores de absorbancia obtenidos para cada punto de las curvas se ajustaron a una recta y se interpolaron los valores de cada muestra en la curva correspondiente, expresando los

resultados como miligramos de EAA (equivalentes de ácido ascórbico) por gramo de muestra.

3.2.6. Determinación de la actividad antimicrobiana

3.2.6.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana en cultivo líquido de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en matraces

La inhibición del crecimiento microbiano se determinó en medio líquido en matraces, se realizó un pre inóculo de *E. coli* y *S. aureus* en una dilución 1 en 10 en medio LB, incubado a 25 °C durante 24 horas en agitador orbital. Posterior, se midió la absorbancia del pre inóculo en el espectrofotómetro Shimadzu UVmini 1240 empleando celdas de cuarzo, de manera de inocular $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Se colocaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL por duplicado; 1 mL de pre cultivo, 39 mL de medio LB y 10 mL de M1 o M2 al 20%, y 1 mL de precultivo, 46,5 mL de medio LB y 2,5 mL de M1 o M2 al 5%.

Se realizaron diversos controles para validar el ensayo, el control de crecimiento constó de 1 mL de pre cultivo en 49 mL de medio LB, el control de inhibición de crecimiento fueron 48 mL de medio LB, 1 mL de pre cultivo y 1 g persulfato de amonio, por último, el control de medio se compuso 50 mL de medio LB.

Se incubaron los matraces a 25 °C en un agitador orbital y se realizaron mediciones de la densidad óptica a 600 nm (OD600) en el espectrofotómetro Shimadzu UVmini 1240, empleando celdas de cuarzo, cada 1 hora a temperatura ambiente durante 10 horas. El ensayo fue repetido 3 veces.

Los resultados obtenidos se procesaron con el software GraphPad Prism 8.0.2. Se expresaron como una curva de crecimiento bacteriano representado por la OD (600) en función del tiempo.

3.2.6.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana en cultivo líquido de *Candida albicans* en placa

La inhibición del crecimiento microbiano se determinó en medio líquido en placa de 96, se realizó un pre inóculo de *C. albicans* en una dilución 1 en 10 en medio YPD, incubado a 25 °C por 24 horas en agitador orbital. Posterior, se midió la absorbancia del pre inóculo

en el espectrofotómetro Shimadzu UVmini 1240 empleando celdas de cuarzo, de manera de inocular $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Se colocaron en una placa de 24 pocillos 1.092 μ L de medio, 28 μ L de pre inóculo y 280 μ L para las muestras M1 y M2 al 20%, mientras que para M1 y M2 al 5% se agregaron 1.302 μ L de medio, 28 μ L de pre inóculo y 70 μ L de muestra.

Para validar el ensayo se realizó un control de crecimiento que constó de 28 μ L de pre inóculo en 1.372 μ L de medio YPD, como control de inhibición de crecimiento se agregaron 1.344 μ L de medio YPD, 28 μ L de pre cultivo y 28 μ g persulfato de amonio, por último, el control de medio constó de 1.400 μ L de medio YPD sin inóculo microbiano.

Se realizaron mediciones de la densidad óptica a 600 nm (OD600) cada 1 hora utilizando un lector de placas TECAN Infinite M200 PRO, a una temperatura de 37 °C durante 27 horas. El ensayo fue repetido 3 veces.

Los resultados obtenidos se procesaron con el software GraphPad Prism 8.0.2. Se expresaron como una curva de crecimiento bacteriano representado por la OD (600) en función del tiempo.

3.2.7. Generación de liofilizado

Se evaluó la posibilidad de liofilizar las muestras M1 y M2 realizándolo por duplicado en el liofilizador de laboratorio Telstar LyoQuest.

Previo a la liofilización, se midió y registró la masa de un vial de liofilización y se colocaron 3 mL de la muestra en él. Se volvió a registrar la masa, esta vez con la muestra incluida, y se colocó en un congelador a -80 °C durante 24 horas. Finalmente, se puso el vial en el liofilizador a una presión de vacío de 0.1 mbar y una temperatura de -50 °C, basándonos en las condiciones con algunas modificaciones de Larrea (2012). Luego de 72 horas, se retiró el vial del equipo y se registró su masa nuevamente. [32]

3.2.8. Determinación de la capacidad emulsionante

Para probar la actividad y estabilidad emulsionante del extracto, se adaptó el protocolo propuesto por Ralla et al. (2018). Se analizaron tres emulsiones variando entre las concentraciones de aceite, agua y extracto. Cada condición fue homogeneizada a 13.000 rpm durante 2 minutos con el propósito de obtener un alto cizallamiento, y luego fue

expuesta a diferentes condiciones desafiantes con la finalidad de realizar distintos estudios de estabilidad acelerada. Luego de cada estudio, las muestras se observaron en un microscopio óptico con un aumento de 40X con el fin de evaluar la microestructura de la emulsión, la cual se analizó mediante el software de análisis de imágenes *ImageJ*, y también se realizó un análisis visual con el fin de apreciar la separación de fases. [33]

Las proporciones utilizadas fueron:

1. 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua.
2. 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua.
3. 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.

Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

1. A temperatura ambiente se evaluaron al instante de generar la mezcla, a los 15 y 30 días.
2. Se incubaron a 50 °C y 74 °C durante 30 minutos y enfriaron en hielo por 5 minutos, se evaluó luego del enfriado.
3. Se congelaron a -28 °C durante 21 horas y descongelaron 3 horas durante 3 días, se evaluó al finalizar el ensayo el tercer día.
4. Se centrifugaron a 3.000 rpm durante 30 minutos, se evaluó al instante de finalizar la centrifugación.

3.2.9. Cultivos celulares

3.2.9.1. Líneas celulares

Para la presente investigación se utilizaron las líneas celulares comerciales adquiridas en ATCC de queratinocitos humanos HaCaT (#200-011TM) y de fibroblastos humanos HDF1 (#SCRC-1041TM). Las células crecen en adherencia y fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM High Glucose (4,5 g/L) (Corning Scientific) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), que llamaremos medio de cultivo completo. Las mismas se incubaron en estufa a 37 °C y a una atmósfera controlada con 5 % de CO₂ en botellas T-25 o T-75. [34] [35]

3.2.9.2. Descongelado celular

Las células fueron criopreservadas en un tanque de nitrógeno líquido (Taylor Wharton CRYO REFRIGERATOR HC20, Fisher Scientific). Para descongelarlas, se retiró el criovial del tanque de nitrógeno, se colocó sobre hielo y luego se introdujo en un baño de agua previamente termostatizado a 37 °C hasta que el contenido del criovial se volvió líquido, aproximadamente en 1 minuto. Se mezcló con 9 mL de medio de cultivo completo previamente termostatizado y se centrifugó a 200 xg durante 5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo completo. Se realizó el recuento celular en una cámara de Neubauer (Marienfeld 0,100mm 35 mm/0,0025 mm²) utilizando el colorante azul de tripán para verificar la cantidad y viabilidad celular. Luego se transfirieron una cantidad determinada de células a una botella T-25 o T-75 según la necesidad, en medio de cultivo completo y se incubaron en una estufa a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. [36]

3.2.9.3. Criopreservación celular

Para llevar a cabo la criopreservación de las células, se comenzó con un subcultivo celular con una confluencia de aproximadamente 80-90% y una viabilidad celular superior al 95%. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS 1X y se añadió 20 µL/cm² de tripsina-EDTA. Luego, las células cultivadas se incubaron en una estufa a 37 °C durante 5 a 10 minutos, hasta observar bajo el microscopio que las células se habían desprendido del sustrato. [36]

Después del tiempo de incubación, se añadió medio de cultivo completo (el doble del volumen de tripsina) para inactivar esta última. Se tomó una alícuota para realizar el recuento de las células totales utilizando la cámara de Neubauer. Mientras tanto, el resto de las células se centrifugaron a 260 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio de criopreservación (90% SFB + 10% DMSO) en un volumen suficiente para obtener entre 2x10⁶ y 3x10⁶ células/mL aproximadamente. Se alicuotó 1 mL de esta suspensión en los crioviales y luego se colocaron en el Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Scientific™, #5100-0001) a -80 °C durante 24 horas. Posteriormente, los crioviales se trasladaron al tanque de nitrógeno líquido para su conservación. [36]

3.2.10. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares no tumorales

El presente ensayo se realizó empleando el método de cristal violeta. Para esto se emplearon cultivos en botellas T-75 cm² para HaCat y HDF1 asegurando que las células estuvieran en fase de crecimiento exponencial. Se retiró el medio y se lavó con PBS, luego se añadieron 3 mL de tripsina-EDTA (0,05% tripsina, 0,02% Na₂EDTA en PBS) y se incubaron las células durante 10 minutos a 37 °C. Posterior a la incubación se observó bajo el microscopio que se hubieran desprendido, luego, se neutralizó con 3 mL de medio de cultivo completo y se tomó una alícuota de 20 µL para el recuento celular. La concentración celular se ajustó en medio de cultivo completo para sembrar 100 µL por pocillo, a una concentración de 3x10⁴ células/mL en una placa de 96 pocillos. Se colocaron 100 µL de PBS en los pocillos de los bordes de la placa y se incubó durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂.

24 horas después, se prepararon diluciones de los compuestos a ensayar. Para el compuesto M1, se realizaron 10 diluciones seriadas en medio de cultivo completo desde una dilución 1/2 hasta 1/1024, y para el compuesto M1 evaporado (se evaporó el etanol de M1 1/4 del volumen a 45 °C) 5 diluciones seriadas desde 1/2 hasta 1/32. Se prepararon diversos controles para validar el ensayo, el control de interferencia (medio de cultivo con 1/2 del compuesto correspondiente sin células), control de medio (medio de cultivo sin células), control de células (células con medio de cultivo) y control de lisis (células con detergente Tritón X-100 al 2%). Se monitoreó el estado de las células bajo el microscopio, se retiró el medio de cultivo de los pocillos, se agregaron 100 µL de las diluciones de los compuestos a testear y los controles en los pocillos correspondientes, incubando durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂.

A las 24 horas, se chequeó el estado de las células bajo el microscopio, se descartó el medio de cultivo de los pocillos de la placa, se agregaron 50 µL de Cristal Violeta al 0,75% en Metanol 40% por pocillo y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C. Luego, se descartó el colorante y se eliminó el exceso de colorante sumergiendo la placa en agua. La placa se secó por golpeteo sobre papel absorbente y se dejó escurrir unos minutos. Se agregaron 250 µL de ácido acético al 20% por pocillo y se homogeneizó suavemente hasta observar una coloración uniforme en cada pocillo. Finalmente, se determinó la

absorbancia a 595 nm en el lector de placas Multiskan FC de Thermo Scientific. El ensayo fue repetido 5 veces.

Los resultados obtenidos se procesaron con el software GraphPad Prism 8.0.2, a los datos se les restaron los controles de medio e interferencia según correspondía, para luego normalizar los datos tomando como el 100% el control de células y el 0% el control de lisis. Se expresó la viabilidad celular en función de las diluciones de M1 ensayadas.

3.2.11. Evaluación de la capacidad fotoprotectora frente a exposición UV

El ensayo descrito a continuación se realizó empleando el método del MTT, utilizando el protocolo de Lapido et al. (2023) con ciertas modificaciones. [37] Para esto, se emplearon cultivos en botellas T-75 cm² para HaCat y HDF1 asegurando que las células estuvieran en fase de crecimiento exponencial. Se retiró el medio y se lavó con PBS, luego se añadieron 3 mL de tripsina-EDTA (0,05% tripsina, 0,02% Na₂EDTA en PBS) y se incubaron las células durante 10 minutos a 37 °C. Posterior a la incubación se observó bajo el microscopio que se hubieran desprendido, sucedido lo anterior mencionado, se neutralizó con 3 mL de medio de cultivo completo y se tomó una alícuota de 20 µL para el recuento celular. La concentración celular se ajustó en medio de cultivo completo para sembrar 100 µL por pocillo, a una concentración de 1,5x10⁴ células/mL, en una placa de 96 pocillos. Se colocaron 100 µL de PBS en los pocillos de los bordes de la placa y se incubó durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂.

Luego de 12 horas se prepararon diluciones de los compuestos a ensayar. Para el compuesto M1, se realizaron 10 diluciones seriadas en medio de cultivo completo desde una dilución 1/2 hasta 1/256, y para el compuesto M1 evaporado 5 diluciones seriadas desde 1/2 hasta 1/32. Se emplearon diferentes controles para validar el ensayo como el control de interferencia (medio de cultivo con 1/2 del compuesto correspondiente sin células), control de medio (medio de cultivo sin células), control de células (células con medio de cultivo) y control de lisis (células con detergente Tritón X-100 al 2%). Se monitoreó el estado de las células bajo el microscopio, se retiró el medio de cultivo de los pocillos, se agregaron 100 µL de las diluciones de los compuestos a testear y los controles en los pocillos correspondientes, incubando durante 10 horas a 37 °C con 5% de CO₂.

A las 34 horas, se chequeó el estado de las células bajo el microscopio, se descartó el medio de cultivo de los pocillos y se agregó medio DMEM sin SFB. Se tapó la placa con papel aluminio doble desde la columna 8 hasta la 12, mientras que las columnas 1 a 7 quedaron expuestas a la radiación UV. La placa se incubó durante 30 minutos, con una máquina para esmaltado de uñas en gel conteniendo una lámpara UV-A (9W) alcanzando una irradiación de 10 W/m². Luego se retiró el DMEM sin suero y se agregó 100 µL de medio de cultivo completo. Finalmente, se incubó durante 22 horas a 37 °C con 5% de CO₂.

Posteriormente, se chequeó el estado de las células bajo el microscopio, se retiró el medio y se lavó con PBS. Se agregaron 130 µL de MTT a 0,5 mg/mL a cada pocillo y se incubaron durante 2,5 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Se removieron 75 µL de la solución de los pocillos y se adicionaron 50 µL de DMSO. Luego, se incubó durante 30 minutos a 37 °C con 5% de CO₂ y se homogeneizó. Finalmente, se determinó la absorbancia a 562 nm en el lector de placas Multiskan FC de Thermo Scientific. El ensayo fue repetido 5 veces.

Los resultados obtenidos se procesaron con el software GraphPad Prism 8.0.2, a los datos se les restaron los controles de medio e interferencia según correspondía, para luego normalizar los datos tomando como el 100% el control de células y el 0% el control de lisis. Se expresó la viabilidad celular en función de las diluciones de M1 ensayadas.

3.2.12. Evaluación del efecto modulador de actividad de metaloproteasas de los extractos mediante ensayo de Zimograma

Se realizó un zimograma para evaluar la actividad diferencial de MMP-2 y MMP-9 en las líneas celulares HaCaT y HDF1 frente a la exposición al extracto M1. Para esto se sembraron en una placa de 24 pocillos, 8x10⁴ células por pocillo en DMEM con 10% SFB y se incubaron a 37 °C, durante 24 horas con 5% CO₂. Pasado ese tiempo, se retiró el sobrenadante y a cada línea se le colocó una dilución 1/64 de M1 en DMEM y de M1 en DMEM con 10% SFB. Se realizaron pocillos de cada línea con medio como control, utilizando DMEM y DMEM con 10% SFB. Se incubaron 24 horas en las mismas condiciones y se retiró el sobrenadante para analizar.

El protocolo utilizado, adaptado del método de Ren et al. (2017) [38], consistió en realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% (m/v) con un 1% (m/v) de gelatina como sustrato. La electroforesis se llevó a cabo en frío a 120 V y con amperaje libre, utilizando un buffer de corrida Tris-Glicina 3% - 15% (30 g de Tris Base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS) con el pH ajustado a 6,8. Las muestras se cargaron con buffer de carga sin reductor y no se calentaron para preservar la actividad enzimática. De todas las muestras se sembraron 20 μ L. Como control positivo de actividad enzimática se utilizó colagenasa de Sigma-Aldrich (código C6885) de 2 mg/mL y se sembró la misma cantidad.

El gel obtenido se lavó 3 veces durante 30 minutos con una solución de Tritón X-100 2% (v/v) (2 mL de tritón en 98 mL de agua destilada), luego se lavó 3 veces durante 5 minutos con agua destilada, posteriormente se lavó con Buffer para MMP (Tris 0,25 M, NaCl 1M, CaCl₂ 0,025 M) a pH 7 (0,28 g de Tris, 58,44 g de NaCl, 2,77 g de CaCl₂), y se dejó incubando en el mismo buffer 48 horas a 37 °C en agitación. Pasado ese tiempo el gel se tiñó con una solución de tinción de Coomassie G (0,5 g de Coomassie G, 100 mL de metanol, 80 mL de agua destilada, 20 mL de ácido acético) durante 1 hora a 37 °C y se destiñó con solución de desteñido (100 mL de ácido acético, 300 mL de metanol y 600 mL de agua destilada). Se reveló el gel utilizando el transiluminador Life Technologies E-Gel® Imager.

3.2.12.1. SDS-PAGE

Se realizó un SDS-PAGE para evaluar el perfil proteico de las muestras y poder compararlo con los resultados del ensayo de zimograma. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (m/v). La electroforesis se llevó a cabo en frío a 120 V y con amperaje libre, utilizando un buffer de corrida Tris-Glicina 3%-15% (30 g de Tris Base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS) con el pH ajustado a 6,8. Las muestras se cargaron con buffer de carga con reductor y se calentaron 5 minutos a 95 °C para preservar la actividad enzimática. De todas las muestras se sembraron 20 μ L; como control positivo de actividad enzimática se utilizó colagenasa de Sigma-Aldrich (código C6885) de 2 mg/mL y se sembró la misma cantidad. El gel se tiñó con una solución de tinción de Coomassie G (0,5 g de Coomassie G, 100 mL de metanol, 80 mL de agua destilada, 20 mL de ácido acético) durante 1 hora a 37 °C y se destiñó con solución de desteñido (100 mL de ácido acético,

300 mL de metanol y 600 mL de agua destilada), el mismo se reveló utilizando el transiluminador Life Technologies E-Gel® Imager.

4. Resultados y discusión

En el siguiente apartado se describirán los resultados obtenidos de los ensayos realizados descritos anteriormente para caracterizar a las muestras generadas.

4.1. Generación de extractos

Se logró generar los extractos botánicos que representaron el principal material de estudio utilizado durante este trabajo. Estos fueron almacenados en freezer a -20 °C y a partir de este stock, se tomaron alícuotas que fueron conservadas en heladera a 4 °C para realizar los ensayos descritos a continuación.

4.2. Test Afrosimétrico de espuma

Las saponinas son un biosurfactante proveniente de las plantas. Los surfactantes son moléculas anfipáticas que reducen la tensión superficial e interfacial entre fluidos de diferentes polaridades, por lo que son ampliamente utilizados en cosmética en productos que generan espuma como jabones, shampoos, etc. Estructuralmente las saponinas están compuestas por una aglicona no polar unida a un carbohidrato polar, dependiendo del tipo de aglicona existen dos tipos de saponinas, las esteroideas y triterpénicas. Las saponinas con estructuras triterpénicas generan espumas y emulsiones más estables, a diferencia de aquellas que poseen una baja cantidad de residuos de azúcar y baja cantidad de enlaces de hidrógeno entre estos residuos, que son menos solubles en agua y debilitan la tensión interfacial, lo que resulta en una baja formación de espuma. [39]

Este ensayo permite determinar la presencia de saponinas mediante la capacidad del extracto de formar una espuma persistente, sin embargo, la no formación de espuma no indica la ausencia de saponinas, ya que existe evidencia bibliográfica que estipula que la capacidad de generar espuma no está directamente relacionada con la disminución de la tensión superficial generada por estas moléculas. Es por lo mencionado anteriormente que esta técnica tiene un carácter cualitativo y no cuantitativo. [40]

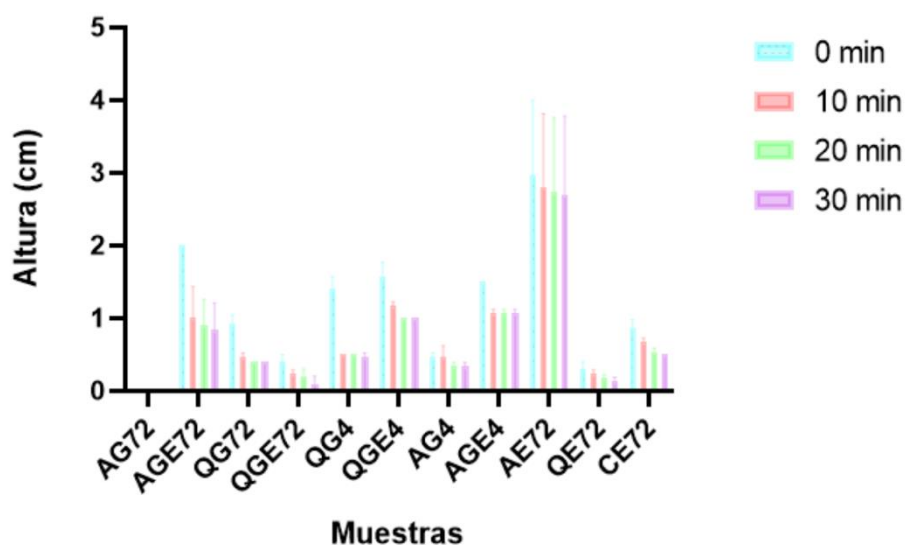


Figura 4. Resultados del test afrosimétrico (test de espuma). En celeste, rojo, verde y violeta, la altura de espuma en centímetros para cada muestra a tiempo 0, 10, 20 y 30 minutos respectivamente. AG72: muestra de avena extraída con agua y glicerina por 4 horas a 45 °C, AGE72: muestra de avena extraída con agua, glicerina y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, QG72: muestra de quinoa extraída con agua y glicerina por 72 horas a temperatura ambiente, QGE72: muestra de quinoa extraída con agua, glicerina y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, QG4: muestra de quinoa extraída con glicerina y agua por 4 horas a 45 °C, QGE4: muestra de quinoa extraída con agua, glicerina y etanol, por 4 horas a 45°C, AG4: extracción de avena con agua y glicerina por 4 horas a 45 °C, AGE4: muestra de avena extraída con agua, glicerina y etanol, por 4 horas a 45 °C, AE72: muestra de avena extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, QE72: muestra de quinoa extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, CE72: muestra de caléndula extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente.

Como se puede apreciar claramente en la Figura 4, de todas las muestras, el extracto AE72 fue el que obtuvo un mayor nivel de espuma persistente. Continuando por las distintas muestras de avena, para los diferentes tipos de extracción, se puede evidenciar como hubo un mayor nivel de espuma para las extracciones realizadas con etanol, glicerina y agua, tanto para 72 horas como para 4 horas, por sobre las extracciones realizadas únicamente con glicerina y agua, visualizando un aumento significativo cuando la extracción se realizó únicamente con etanol y agua, lo que podría indicar que el etanol mejora la extracción de saponinas en este caso. Analizando la muestra AG72 en la cual no se pudo visualizar formación de espuma, no se puede concluir que la presencia de saponinas es nula, dado que como se mencionó anteriormente, no todas las saponinas poseen la capacidad de generar espuma, para esto es necesario realizar una cuantificación, la cual se realizó y se discutirá más adelante. Dado que todas las muestras de avena excepto

AG72 presentaron espuma persistente mayor a 0,2 cm pasados 10 min, se consideran resultados positivos para la presencia de saponinas.

Siguiendo con las muestras de quinoa, se puede ver que la muestra QGE4 fue la que tuvo un mayor nivel de espuma y se puede apreciar como la muestra QG4 tuvo un nivel similar a tiempo 0 min, pero este decayó notoriamente pasados los 10 min. También si se compara el método de extracción de 4 horas a 45 °C con el de 72 horas a temperatura ambiente, se puede ver como en este último para ambas soluciones se apreció un menor nivel de espuma desde el tiempo 0 min. Por otro lado, si se comparan las extracciones con solución de glicerina, etanol y agua, con las realizadas con glicerina y agua, se puede observar cómo para estas últimas, el nivel de espuma pasado el tiempo 0 minuto decae visiblemente. También se puede distinguir como la extracción realizada con etanol y agua tuvo uno de los niveles de espuma más bajo dentro de esta planta, a diferencia de la avena que fue la extracción más prometedora. En el caso de la quinoa todas las muestras cumplen con el criterio para ser consideradas positivas para la presencia de saponinas.

Por último, la extracción de caléndula también presenta un resultado positivo y se puede apreciar como el nivel de espuma decrece de forma proporcional al tiempo transcurrido. En base a estos resultados cualitativos se puede concluir que la gran mayoría de las muestras presentan saponinas, lo cual concuerda con lo reportado en bibliografía. [40] [41] [42]

4.3. Barridos Espectrales

Los picos de absorción de las saponinas y polifenoles en el espectro UV-VIS pueden variar dependiendo de la estructura específica de cada compuesto, pero existen rangos característicos donde estos compuestos absorben la luz de manera más efectiva.

Dentro de los polifenoles hay varios subgrupos, los ácidos fenólicos absorben en el rango de 250 - 300 nm, como el caso del ácido gálico que absorbe a 271 nm (Anexo 8.2). Los flavonoides, que absorben en el anillo B de su estructura, se dan en el rango de 240 - 280 nm, mientras que los que absorben en el anillo A, lo realizan en el rango de 300 - 400 nm.

Otro ejemplo es el de la quercetina, muestra picos alrededor de 256 nm y 374 nm correspondientes a la absorción del pico B y A respectivamente (Anexo 8.2). [43]

Las saponinas son un glicósido que tienen picos de absorción en un rango de 200 - 220 nm. Específicamente las saponinas triterpénicas, oleanólicas y avenocósidos absorben a 220 nm debido a su estructura que incluye anillos aromáticos. [44]

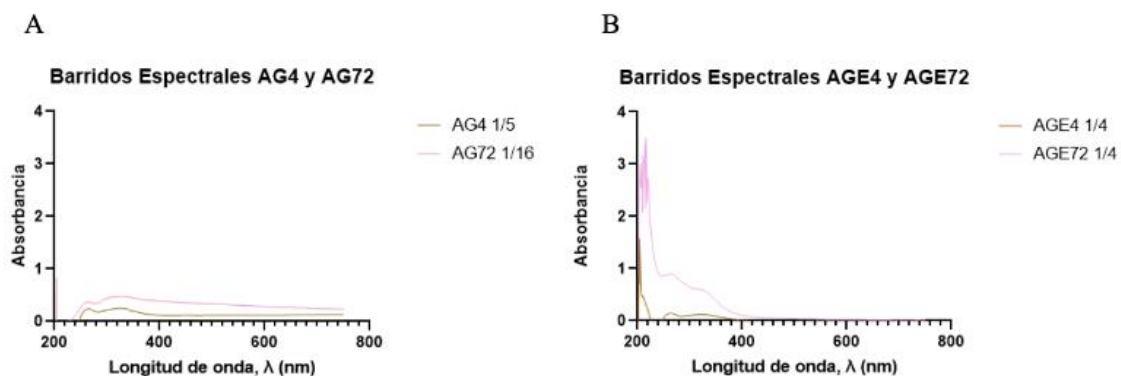


Figura 5. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 800 nm. (A) AG4: muestra de avena extraída con 50% agua y 50% glicerol durante 4 horas a 45 °C, AG72: muestra de avena extraída con 50% agua y 50% glicerol durante 72 horas a temperatura ambiente. (B) AGE4: muestra de avena extraída con 50% agua, 30% glicerol y 20% etanol durante 4 horas a 45 °C, AGE72: muestra de avena extraída con 50% agua, 30% glicerol, 20% etanol durante 72 horas a temperatura ambiente.

Como se puede observar en la Figura 5. A, el espectro de absorción de AG4 y AG72 muestran picos alrededor de 220 nm y 250 nm. En la Figura 5. B, se evidencian picos de absorción para las muestras AGE4 y AGE72 en 220 nm y 270 nm.

Comparando las condiciones de incubación tanto para las muestras extraídas con los solventes 50% agua y 50% glicerol, frente a las extraídas con 50% agua, 30% glicerol y 20% etanol, el estudio demuestra que hay un mayor pico de absorción para los extractos que se incubaron durante 72 horas a temperatura ambiente frente a los de 4 horas a 45 °C.

Por los espectros visualizados anteriormente, se podría inferir que los extractos de avena presentan compuestos fenólicos, flavonoides y avenacósidos. [43] [44] Para el caso de AGE72 se observa que el pico es más pronunciado que el resto, esto sugiere que la extracción que incluye el solvente con etanol y un mayor periodo de incubación podría aumentar la concentración de saponinas y polifenoles en la muestra.

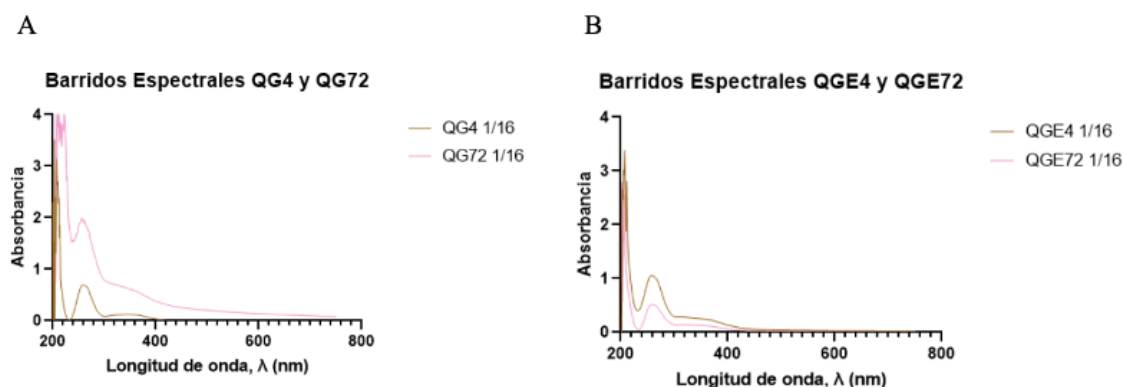


Figura 6. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 800 nm. (A) QG4: muestra de quinoa extraída con 50% agua y 50% glicerol durante 4 horas a 45 °C, QG72: muestra de quinoa extraída con 50% agua y 50% glicerol durante 72 horas a temperatura ambiente. (B) QGE4: muestra de quinoa extraída con 50% agua, 30% glicerol y 20% etanol durante 4 horas a 45 °C, QGE72: muestra de quinoa extraída con 50% agua, 30% glicerol, 20% etanol durante 72 horas a temperatura ambiente.

Como se puede observar tanto en la Figura 6. A, como en la Figura 6. B, el espectro de absorción de QG4, QG72, QGE4 y QGE72 muestran un pico alrededor de 220 nm. Los espectros visualizados anteriormente, podrían inferir que los extractos de quinoa presentan polifenoles y saponinas. En todos los casos se observan picos a 220 nm, que según estudios realizados por R. Tsao (2010), la quinoa presenta dicho pico de absorción para los polifenoles como el ácido ferúlico, ácido cinnámico, quercetina, kaempferol y alfa - tocoferol. [43] Dentro de las saponinas reportadas que absorben a 220 nm, encontramos a la saponina B y ácido oleanólico. [44] Para los extractos ensayados, las muestras que tienen picos más pronunciados son las que fueron extraídas con agua y glicerina en partes iguales (Figura 6. A), pero aun así la que supera el pico de absorción es QG72, que tuvo un tiempo de incubación de 72 horas a temperatura ambiente.

Para el caso de QGE4 y QGE72 (Figura 6. B), observamos que ocurre lo contrario, a mayor tiempo de exposición menor es el pico de absorción, esto puede deberse al solvente de extracción utilizado, que en este caso el agregado es etanol y disminución del glicerol.

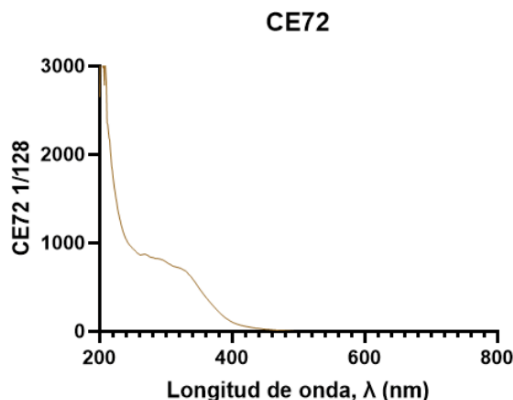


Figura 7. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 800 nm. CE72: muestra de caléndula extraída con 50% agua y 50% etanol durante 72 horas a temperatura ambiente.

Entre los compuestos bioactivos presentes en la caléndula se encuentran las saponinas y los polifenoles, los cuales pueden absorber luz en las regiones observadas en el estudio, las saponinas contienen grupos funcionales con doble enlace carbono oxígeno y así como grupos éter que absorben en el rango de los 220 nm, mientras que la absorción a 260 nm puede ser por parte de los triterpenoides. A su vez, la absorción a 220 nm por parte de los polifenoles puede deberse a ácidos fenólicos, mientras que a 260 nm absorben los flavonoides por su anillo bencénico. [17]

En la Figura 7 se evidencia el espectro de absorción del extracto de caléndula, realizado con los solventes etanol y agua en partes iguales incubándolo por 72 horas a temperatura ambiente. Se denotan picos a 220 y 260 nm, comparándolo con los espectros de absorción de los extractos de avena y quinoa, son aún mayores en concentración, por ende, evidencia la presencia de polifenoles y saponinas en el extracto en mayor cantidad.

4.4. Cuantificación de saponinas

Como se mencionó anteriormente, las saponinas son un compuesto de alto interés en la industria cosmética, por su capacidad tensioactiva útil para la formación de emulsiones. Con el objetivo de cuantificar las saponinas presentes, se realizó el ensayo de vainillin-sulfúrico, un método colorimétrico con alta reproducibilidad por ser sencillo y brindar resultados confiables.

Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de escina entre 0,2 y 1,8 mg/mL en las distintas matrices de extracción, para luego interpolar los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra y así obtener la concentración de saponinas para cada extracto.

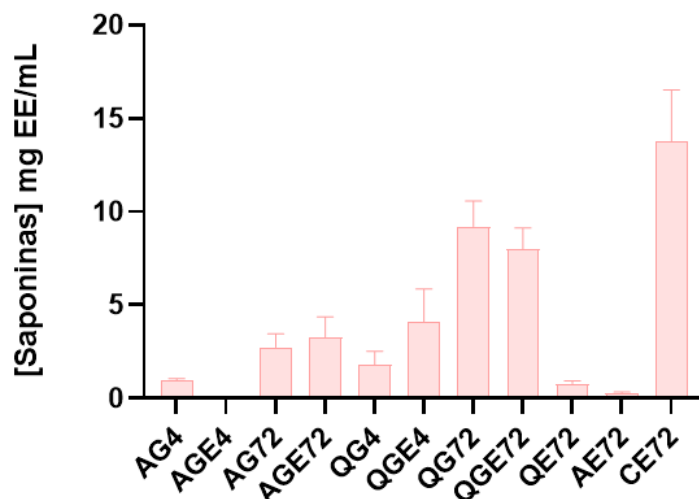


Figura 8. Cuantificación de saponinas y compuestos triterpénicos en las muestras obtenidas expresados como miligramos de equivalentes de escina por mililitro de muestra. AG4: muestra de avena extraída con agua y glicerina por 4 horas a 45 °C, AGE4: muestra de avena extraída con agua, glicerina y etanol, por 4 horas a 45 °C, AG72: muestra de avena extraída con agua y glicerina por 72 horas a temperatura ambiente, AGE72: muestra de avena extraída con agua, glicerina y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, QG4: muestra de quinoa extraída con glicerina y agua por 4 horas a 45 °C, QGE4: muestra de quinoa extraída con agua, glicerina y etanol, por 4 horas a 45 °C, QG72: muestra de quinoa extraída con agua y glicerina por 72 horas a temperatura ambiente, QGE72: muestra de quinoa extraída con agua, glicerina y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, QE72: muestra de quinoa extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, AE72: muestra de avena extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente, CE72: muestra de caléndula extraída con agua y etanol por 72 horas a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Figura 8, apreciamos notoriamente que el extracto de caléndula obtuvo la mayor concentración de saponinas, esperable según lo reportado en bibliografía. [45]

Analizando los resultados para los extractos de avena, se puede visualizar que el extracto AGE72 fue el que obtuvo una mayor concentración, se puede ver como el extracto AE72 es una de las muestras de avena con menor concentración de saponinas, seguida por la muestra AGE4 en la que se observa una concentración de saponinas nula. Las muestras

restantes, AG4 y AG72, muestran niveles de saponinas intermedios dentro de los distintos extractos analizados para esta planta.

Continuando con los extractos de quinoa, se puede observar que los extractos QG72 y QGE72 obtuvieron altas concentraciones de saponinas, siendo QG72 levemente mayor. Los demás extractos tuvieron concentraciones de saponinas intermedias.

Se puede apreciar cómo para cada planta se obtuvo una mayor concentración de saponinas cuando las extracciones se realizaron por 72 horas a temperatura ambiente. Los resultados de la cuantificación son más confiables frente a los obtenidos en las muestras de screening como los test afrosimétricos y barridos espectrales realizados, ya que esta técnica detecta saponinas con estructuras químicas más cortas y saponinas insolubles en agua, a diferencia del test de espuma. Por lo mencionado anteriormente se explica la diferencia entre resultados para una misma muestra, es el caso de la muestra CE72 la cual presenta una mayor cuantificación de saponinas y un bajo nivel de espuma. La presencia de saponinas en los diferentes extractos es de gran importancia para un potencial uso de estos como emulsionantes naturales en la industria cosmética. [46]

4.5. Determinación de las mejores muestras por condiciones de extracción

En base a los resultados descritos anteriormente se decidió continuar con las muestras denominadas: AGE72 (extracción de avena con 30% de glicerol, 20% de etanol y 50% de agua), QG72 (extracción de quinoa con 50% de glicerol y 50% de agua) y CE72 (extracción de caléndula con 50% de etanol y 50% de agua) ya que fueron las que presentaron según el test afrosimétrico, barridos espectrales y cuantificación de saponinas los mejores resultados, es decir, mayor concentración de saponinas. Estas muestras en el proceso de extracción fueron sonicadas por 15 minutos y luego agitadas a temperatura ambiente por 72 horas.

Con dichas muestras se realizaron 2 mezclas diferentes para formular el complejo y continuar analizando en las siguientes etapas del trabajo, denominadas: M1 (Muestra 1, compuesta por 50% de CE72, 30% de QG72 y 20% de AGE72) y M2 (Muestra 2, compuesta por 30% de CE72, 50% de QG72 y 20% de AGE72). El porcentaje definido

se decidió en base a los resultados obtenidos en cuantificación de saponinas, donde la muestra de caléndula presentó una mayor concentración, seguida por la muestra de quinoa, es por esto que se pusieron en mayor proporción y a su vez se alternaron los porcentajes entre muestras para evaluar la posible sinergia entre los diferentes compuestos bioactivos. Para el caso de la muestra de avena, se utilizó en el mismo porcentaje para ambas mezclas ya que a pesar de tener una menor concentración de saponinas igualmente posee moléculas de interés que aportarían a la formulación final.

4.6. Cuantificación de saponinas de las mejores mezclas

Se realizó la cuantificación de saponinas de las mezclas M1 y M2, como se puede observar en la Figura 9, M1 presentó una concentración de 4,6 mg EE/mL significativamente mayor que M2 que fue 3,7 mg EE/mL ($p = 0,0055$), esto era previsible ya que M1 tiene una mayor concentración de extracto de caléndula, el cual obtuvo mayores niveles de saponinas que el resto de los extractos. El estudio realizado por Peng et. al (2019) reportó 641 mg/g de planta seca de cascarilla de quinoa, un número mayor al evidenciado en este ensayo, la explicación de esto puede deberse a que la cascarilla de quinoa tiene una mayor cantidad de saponinas que la quinoa comercial que se utilizó en este ensayo. [22]

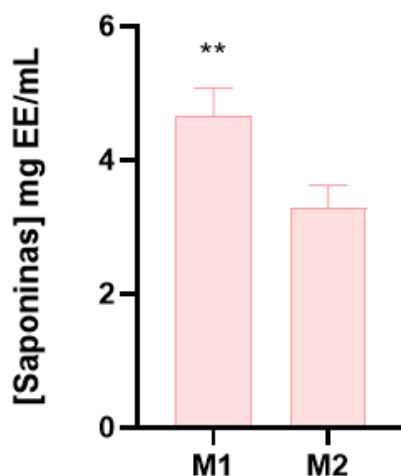


Figura 9. Cuantificación de saponinas y compuestos triterpénicos en las muestras obtenidas expresados como miligramos de equivalentes de escina por mililitro de muestra. M1: 50% extracto de caléndula (CE72), 30% de extracto de quinoa (QG72) y 20% de extracto de avena (AGE72). M2: 30% extracto de caléndula (CE72), 50% de extracto de quinoa (QG72) y 20% de extracto de avena (AGE72). Los resultados se presentan como media \pm Sd; los mismos presentaron una distribución normal de acuerdo a

la prueba de Shapiro-Wilk. Luego fueron analizados mediante la técnica t-test para comparar entre muestras, **indica diferencia significativa ($p = 0,0055$). $n = 3$ repetidos por cada condición.

4.7. Cuantificación de polifenoles

Los polifenoles son una amplia y diversa clase de compuestos naturales que se encuentran predominantemente en las plantas. Están compuestos por múltiples grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos y se caracterizan por sus propiedades antioxidantes ya que actúan como donadores de electrones pudiendo neutralizar los radicales libres. [25] [26]

Para cuantificar los polifenoles en las muestras, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu ya que es una técnica ampliamente utilizada para la cuantificación de estos en diversas matrices. Se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los compuestos fenólicos presentes en la muestra, dicho reactivo contiene ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico, que es reducido por los polifenoles a óxidos de molibdeno y tungsteno, produciendo un complejo de color azul. La intensidad de este color, que se mide espectrofotométricamente, es proporcional a la concentración de polifenoles. Se realizó una curva de calibración empleando ácido gálico, este se utiliza como estándar lo que permite cuantificar los polifenoles en términos equivalentes de ácido gálico. [47]

Los compuestos polifenólicos presentes en la avena, quinoa y caléndula son diversos y contribuyen significativamente a las propiedades antioxidantes de estas plantas. La avena contiene avenantramidas, un grupo único de polifenoles con potentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. [48] La quinoa es rica en flavonoides como quercetina y kaempferol, ambos conocidos por sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios. [18] La caléndula contiene flavonoides como la quercetina y los glucósidos de isorhamnetina, así como compuestos fenólicos como el ácido cafeico, todos ellos con propiedades antioxidantes. [49]

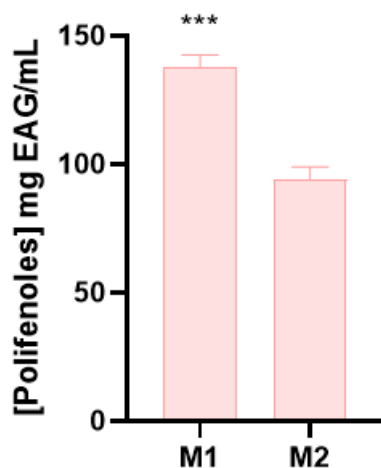


Figura 10. Cuantificación de polifenoles de las muestras M1 y M2 expresado como miligramos de equivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra. Los resultados se presentan como media \pm Sd; los mismos presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk. Luego fueron analizados mediante la técnica t-test para comparar entre muestras, ***indica diferencia significativa ($p = 0,0005$). $n = 3$ repetidos por cada condición.

Los resultados presentados en la Figura 10 muestran la concentración de polifenoles en las muestras M1 y M2, cuantificada mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu con una curva de ácido gálico. La muestra M1 tiene una concentración de polifenoles cercana a los 140 mg EAG/mL significativamente mayor ($p = 0,0005$) a la muestra M2 que presenta una concentración de aproximadamente 94 mg EAG/mL. Según los análisis realizados por Deuschle et al. (2015), reportaron 33,9 mg EAG/g de planta seca de caléndula, mientras que en el presente ensayo logramos extraer 4.666 mg EAG/g de planta seca, el cálculo fue realizado con la concentración total de las 3 plantas en el compuesto. [50]

El ensayo realizado indica que M1 tiene una mayor concentración de polifenoles que M2, esto podría deberse a que una mayor concentración de extracto de caléndula está proporcionando una mayor cantidad de polifenoles. Basado en este resultado, se puede inferir que la muestra M1 probablemente tenga una mayor actividad antioxidante que la muestra M2. Esto se debe a que los polifenoles son agentes antioxidantes efectivos, y su presencia en mayor cantidad generalmente se traduce en una mayor capacidad para neutralizar radicales libres. Para confirmar esta inferencia, se realizaron ensayos de actividad antioxidante en las mismas muestras.

4.8. Cuantificación de la actividad antioxidante

El método del ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) es un ensayo ampliamente utilizado para medir la capacidad antioxidante de diferentes sustancias. Este método se basa en la generación de radicales libres ABTS⁺ y la medición de su capacidad de ser neutralizados por antioxidantes presentes en la muestra en estudio. [31]

En el presente ensayo se decidió realizar estudios de capacidad antioxidante ya que es fundamental para evaluar la eficacia de los compuestos en aplicaciones dermatológicas, especialmente en productos destinados al cuidado de la piel. La piel se encuentra constantemente expuesta a factores ambientales como la radiación ultravioleta, la contaminación y otros agentes oxidativos que pueden generar radicales libres. Estos radicales libres son moléculas altamente reactivas que pueden dañar las células de la piel, provocando envejecimiento prematuro, inflamación y diversas enfermedades cutáneas. [51]

Los antioxidantes son sustancias que pueden neutralizar los radicales libres, evitando así el daño oxidativo. Al evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto a través de ensayos *in vitro*, se puede determinar su potencial para proteger las células de la piel contra el estrés oxidativo. Este tipo de evaluación proporciona una medida cuantitativa de la eficacia del compuesto en términos de su capacidad para donar electrones y neutralizar los radicales libres. [52]

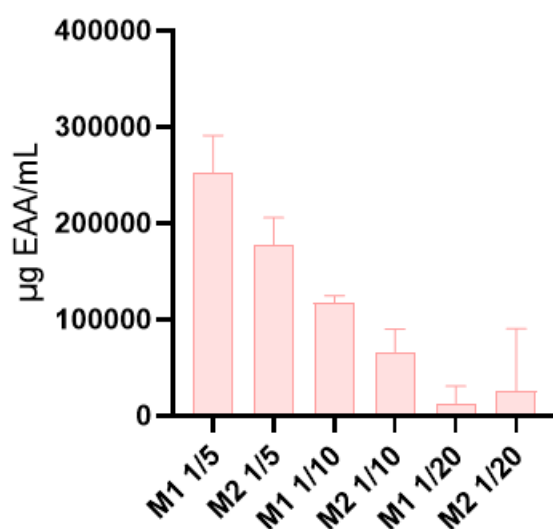


Figura 11. Evaluación de la actividad antioxidante de las muestras M1 y M2 expresado como microgramos de equivalentes de ácido ascórbico por mililitro de muestra. M1 1/5: dilución de M1 1/5, M1 1/10: dilución de M1 1/10, M1 1/20: dilución de M1 1/20, M2 1/5: dilución de M2 1/5, M2 1/10: dilución de M2 1/10, M2 1/20: dilución de M2 1/20. Se analizaron los datos y presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk. Luego fueron analizados mediante la técnica de One-Way ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey,* y ** representan diferencias significativas, M2 1/5 vs M2 1/10 *p = 0,0184, M2 1/5 vs M1 1/20 **p = 0,0012, M2 1/5 vs M2 1/20 **p = 0,0022, M1 1/10 vs M1 1/20 *p = 0,0258. n = 3 repetidos por cada condición.

Los resultados evidenciados en la Figura 11 indican que ambas muestras tienen una notable capacidad antioxidante, con variaciones según la concentración utilizada.

Para la muestra M1, la dilución 1/5 muestra la mayor actividad antioxidante, alcanzando aproximadamente 280.000 µg EAA/mL. A medida que la muestra se diluye (1/10 y 1/20), la actividad antioxidante disminuye progresivamente.

La caléndula que representa el 50% de M1, es conocida por sus propiedades antioxidantes, atribuibles a su alto contenido de flavonoides y carotenoides, compuestos que neutralizan los radicales libres eficientemente. [16] La extracción con agua y etanol en proporciones iguales durante 72 horas con sonicación facilita la solubilización de estos compuestos, mejorando su disponibilidad en el extracto final.

La quinoa, presente en un 30% de M1, es rica en compuestos fenólicos, tocoferoles y flavonoides, todos con propiedades antioxidantes destacadas. [18] La utilización de glicerina y agua como solventes durante la extracción podría maximizar la retención de

estos compuestos bioactivos, dado que la glicerina es un solvente eficiente para compuestos polares.

La avena, aunque constituye sólo el 20% tanto del extracto M1 como M2, aporta avenantramidas y ácidos fenólicos, conocidos por sus propiedades antioxidantes. [15] La combinación de glicerina, etanol y agua como solventes puede extraer eficientemente estos antioxidantes, contribuyendo al perfil antioxidante del extracto. Un ensayo realizado por Deuschle et. al (2015) reportó 250 µg EAA/mL de caléndula, siendo este un valor menor a los resultados de este estudio. [50]

La muestra M2 también sigue una tendencia similar, aunque con menor capacidad antioxidante en comparación con M1. La dilución 1/5 de M2 muestra una actividad cercana a 150.000 µg EAA/mL, disminuyendo significativamente en las diluciones posteriores (1/10 y 1/20).

M2 está compuesto por 30% de caléndula, 50% de quinoa y 20% de avena. La proporción mayor de quinoa en M2, en comparación con M1, podría implicar una mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides aportados por la quinoa, lo cual debería teóricamente incrementar la capacidad antioxidante del extracto. [18]

Sin embargo, los resultados muestran que M2 tiene una capacidad antioxidante inferior a M1 en todas las diluciones, lo que podría explicarse por las diferencias en la composición de estos. El estudio realizado por Ak et al. (2020), encontró que los extractos de caléndula tienen altos niveles de carotenoides, flavonoides y compuestos fenólicos, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante al neutralizar radicales libres y proteger las células del daño oxidativo. En comparación, por lo reportado en Buitrago et al. (2019), aunque la quinoa también contiene flavonoides y ácidos fenólicos con propiedades antioxidantes, su concentración y diversidad son menores, resultando en una capacidad antioxidante moderada y menos eficaz que la de la caléndula para neutralizar radicales libres y proteger contra el estrés oxidativo. [53]

Por lo anteriormente mencionado, la menor proporción de caléndula en M2 podría reducir la efectividad antioxidante general del extracto.

4.9. Determinación de la actividad antimicrobiana

Se realizó el ensayo de actividad antimicrobiana con los microorganismos *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* frente a los compuestos M1 y M2 con la intención de observar si los compuestos bioactivos de las muestras en estudio podrían tener propiedades antimicrobianas.

Se decide ensayar con *E. coli* ya que es una bacteria Gram negativa comúnmente utilizada en pruebas de actividad antimicrobiana debido a su prevalencia en el ambiente y su capacidad para causar infecciones. En la industria cosmética, *E. coli* es uno de los organismos indicativos clave que se utilizan para evaluar la seguridad microbiológica de los productos. Las regulaciones de calidad, como las de la FDA y la European Pharmacopoeia, establecen límites estrictos sobre la presencia de esta bacteria en productos cosméticos, lo que subraya la importancia de realizar pruebas para determinar la seguridad y la calidad del producto. [54]

También se utilizó *S. aureus* que es una bacteria Gram positiva que se encuentra en la piel y las vías respiratorias superiores de los humanos. Es un patógeno conocido por causar infecciones cutáneas, especialmente en condiciones donde la barrera de la piel está comprometida. [55] En la industria cosmética, *S. aureus* es otro organismo indicativo crítico para evaluar la seguridad microbiológica de los productos. La capacidad de esta bacteria para producir toxinas y resistir tratamientos antimicrobianos hace que sea esencial asegurar que los productos cosméticos no solo sean efectivos contra esta bacteria, sino que también sean capaces de prevenir su crecimiento. Las directrices de calidad, como las de la USP (United States Pharmacopoeia), recomiendan pruebas rigurosas contra *S. aureus* para garantizar la seguridad y eficacia del producto. [56]

C. albicans también formó parte del estudio ya que es una levadura oportunista que integra la microbiota de la piel y las mucosas humanas, pero puede causar infecciones cuando el equilibrio microbiano se altera. Es especialmente relevante en el contexto cosmético debido a su capacidad para crecer en ambientes húmedos y con nutrientes ricos, condiciones que son comunes en muchos productos cosméticos. Las pruebas antimicrobianas contra *C. albicans* son cruciales para garantizar que los productos no favorezcan el crecimiento de hongos, lo cual puede llevar a infecciones cutáneas. [57]

El crecimiento bacteriano se puede medir de manera efectiva utilizando el estándar de McFarland y técnicas de absorbancia para cuantificar la concentración bacteriana y monitorear su crecimiento en distintos medios y condiciones. [58]

El estándar de McFarland es una referencia turbidimétrica que estima la concentración de células bacterianas en una suspensión a través de soluciones con diferentes concentraciones de sulfato de bario. Al mezclar estas soluciones con ácido sulfúrico, se forma una suspensión de partículas cuyo tamaño y densidad se asemejan a las de las bacterias utilizadas, permitiendo ajustar la turbidez de una suspensión bacteriana hasta que coincida visualmente con la del estándar deseado. [58]

La determinación de la absorbancia consiste en medir la densidad óptica (OD) de una suspensión bacteriana a una longitud de onda específica, comúnmente 600 nm (OD600), que se correlaciona con la concentración de células bacterianas presentes. A medida que las bacterias crecen y se multiplican, la turbidez de la suspensión aumenta, reflejándose en un aumento de la OD600. [58]

Las diluciones realizadas de las muestras en medio (1/5 y 1/20) se basaron en un rango respecto a las diluciones utilizadas comúnmente para los conservantes de la industria.

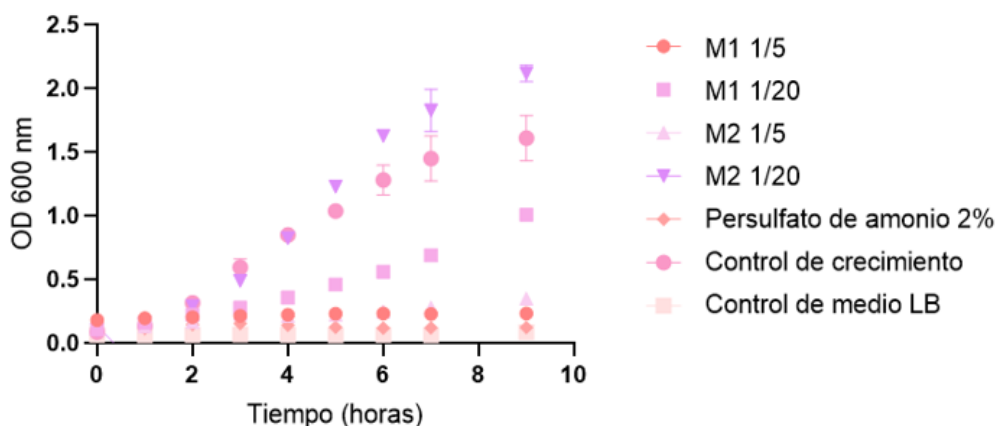


Figura 12. Curva de crecimiento de *E. coli* en medio LB frente a los compuestos M1 y M2. M1 1/5: dilución de M1 1/5, M1 1/20: dilución de M1 1/20, M2 1/5: dilución de M2 1/5, M2 1/20: dilución de M2 1/20, Persulfato de amonio 2%: control de inhibición de crecimiento, Control de crecimiento: *E. coli* en medio LB, Control de medio LB: control negativo de crecimiento.

Los resultados observados en la Figura 12 muestran que las diluciones de M1 y M2 tienen un evidente efecto sobre el crecimiento de *E. coli*. En particular, M1 en una dilución de 1/5 presenta la mayor inhibición del crecimiento bacteriano pudiendo caracterizarlo como bactericida, manteniendo los valores de absorbancia bajos durante las 10 horas de ensayo, comparable a la del control realizado con persulfato de amonio al 2%. M2 también inhibe el crecimiento de *E. coli*, aunque su efecto es menos pronunciado en la dilución 1/20, en este caso notamos un efecto bacteriostático con un aumento del crecimiento hacia el final del tiempo ensayado. Comparado con el control realizado con persulfato de amonio al 2%, ambas muestras muestran un efecto antimicrobiano considerable, con M1 siendo la más efectiva. El control de crecimiento bacteriano en medio LB, como se esperaba, demostró un crecimiento de *E. coli*, lo que valida la metodología empleada.

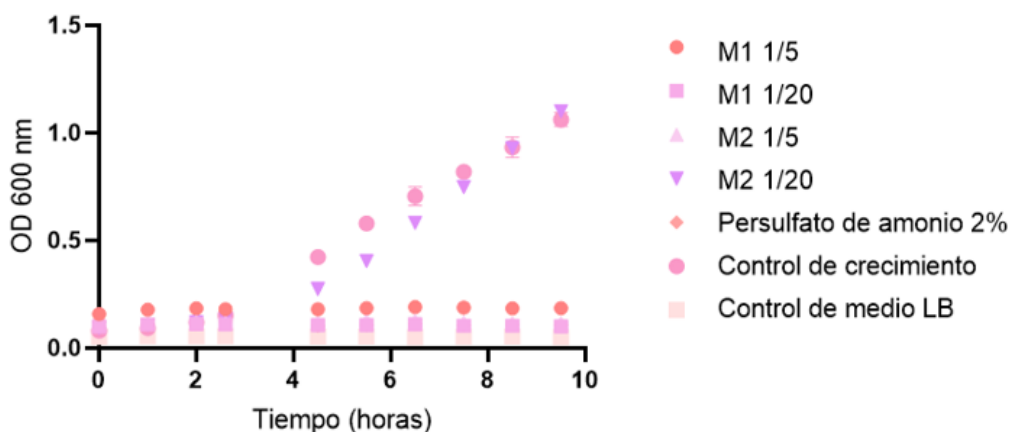


Figura 13. Curva de crecimiento de *S. aureus* en medio LB frente a los compuestos M1 y M2. M1 1/5: dilución de M1 1/5, M1 1/20: dilución de M1 1/20, M2 1/5: dilución de M2 1/5, M2 1/20: dilución de M2 1/20, Persulfato de amonio al 2%: control de inhibición de crecimiento, Control de crecimiento: *S. aureus* en medio LB, Control de medio LB: control negativo de crecimiento.

En el caso de *S. aureus*, se evidencia en la Figura 13 que la dilución de 1/5 de M1 inhibe significativamente el crecimiento bacteriano, reflejado en valores de absorbancia muy bajos en comparación con el control realizado con persulfato de amonio al 2%. M2 muestra actividad antimicrobiana únicamente para la dilución 1/5 ya que para la 1/20 se visualiza el crecimiento bacteriano de la misma manera que en el control de crecimiento bacteriano en medio LB. La eficacia de M1 en la dilución 1/5 es notable, superando la inhibición lograda por M2.

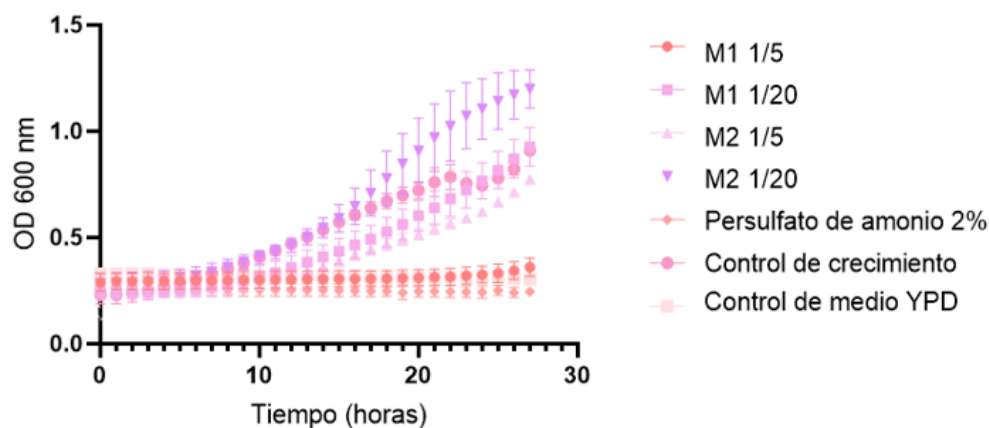


Figura 14. Curva de crecimiento de *C. albicans* en medio YPD frente a los compuestos M1 y M2. M1 1/5: dilución de M1 1/5, M1 1/20: dilución de M1 1/20, M2 1/5: dilución de M2 1/5, M2 1/20: dilución de M2 1/20, Persulfato de amonio al 2%: control de inhibición de crecimiento, Control de crecimiento: *C. albicans* en medio YPD, Control de medio YPD: control negativo de crecimiento.

Para *C. albicans*, se observa en la Figura 14 que las curvas de crecimiento indican que tanto M1 como M2 poseen propiedades antimicrobianas. Sin embargo, la inhibición del crecimiento es más evidente en las primeras 10 horas de observación, con un aumento en la absorbancia más controlado en las muestras tratadas con M1 y M2 en comparación con el control realizado con persulfato de amonio al 2%. M1 en la dilución 1/5 nuevamente muestra la mayor efectividad, manteniendo una baja absorbancia a lo largo del tiempo.

El compuesto M1 1/5 es el que presenta mayor actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, y *C. albicans* en el ensayo realizado, pudiendo observar que presenta un efecto bactericida. La mayor capacidad antimicrobiana del compuesto M1 en comparación con M2 puede atribuirse principalmente a la mayor concentración de caléndula. La caléndula tiene una amplia gama de compuestos bioactivos con fuerte actividad antimicrobiana que no solo inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, sino que también pueden desestabilizar las membranas celulares microbianas, llevando a una muerte celular más efectiva. [59] Si bien la quinoa y la avena contribuyen a la actividad antimicrobiana en ambos compuestos por la presencia de saponinas, la clave para la superioridad de M1 podría radicar en la proporción más alta de caléndula.

4.10. Generación de liofilizado

Se realizó una liofilización de los extractos con el fin de evaluar la capacidad de los mismos de reducir su volumen, analizando así las distintas alternativas posibles para su posterior formulación y comercialización. Pasadas las 48 horas de liofilización de las muestras, estas presentaron una consistencia viscosa, una propiedad previsible debido al porcentaje de glicerina presente en cada muestra, siendo 21% para M1 y 31% para M2. El porcentaje de liofilización de cada extracto se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$\text{porcentaje de liofilizacion} = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} \cdot 100$$

Se obtuvo un porcentaje de liofilización de 74% para M1 y de 64,5% para M2, la diferencia en el porcentaje de ambas muestras confirma el efecto negativo que posee la glicerina sobre la liofilización, ya que M1 dispone de una menor concentración de glicerina y obtuvo un mayor porcentaje de liofilización. Estos resultados podrían optimizarse extendiendo el tiempo de operación, pero la presencia de glicerina impide la obtención de la muestra en estado sólido (formato de polvo), es por esto que, en caso de comercializar el producto, se haría en formato líquido, como otros productos con características similares disponibles en el mercado.

4.11. Selección y optimización de la formulación en base a los parámetros estudiados

En base a los resultados obtenidos se optó por continuar los estudios centrados en la muestra M1, que está formulada con 50% extracto de caléndula (CE72), 30% de extracto de quinoa (QG72) y 20% de extracto de avena (AGE72), ya que dicho extracto posee una mayor concentración de polifenoles (138 mg EAG/mL), una mayor concentración de saponinas (4,67 mg EE/mL), una mayor capacidad antioxidante (1.260 mg EAA/mL), una mejor capacidad antimicrobiana y un mayor porcentaje de liofilización del 74%.

4.12. Determinación de la capacidad emulsionante

Las emulsiones son soluciones compuestas por dos fluidos inmiscibles, comúnmente aceite y agua, donde uno de ellos, denominado fase dispersa forma gotas sumergidas

dentro del otro, denominado fase continua. En la industria cosmética, los emulsionantes son ampliamente utilizados, ya que permiten combinar activos hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que facilita la integración de distintos componentes esenciales en productos para el cuidado personal; son comúnmente utilizadas en la fabricación de lociones y cremas, ya que se considera un vehículo eficiente para la administración de componentes activos favoreciendo su absorción en la piel. [60]

El actual aumento de la demanda por parte de los consumidores a alternativas amigables con el medioambiente, en adición al aumento de legislaciones medioambientales restrictivas, ha presionado a las empresas a sustituir los compuestos químicos utilizados en la producción, por su equivalente de origen natural, sin sacrificar la integridad ni la funcionalidad de la formulación. Adicionalmente se sabe que los emulsionantes sintéticos comúnmente utilizados, como Tween® y Spans, generan un impacto sustancial en el medio ambiente, ya que derivan de procesos petroquímicos y tienen baja biodegradabilidad, así como en la salud humana, porque se han asociado con efectos adversos como reacciones alérgicas e irritación de la piel. [61]

Las saponinas son importantes emulsionantes naturales, con un amplio uso en la industria cosmética por sus diversas propiedades biológicas y fisicoquímicas. Gracias a su estructura anfifílica y alta actividad superficial, se han estudiado distintas saponinas de origen natural como emulsionantes alternativos, probando su funcionalidad para generar emulsiones estables frente a distintas condiciones desafiantes. Las emulsiones pueden clasificarse según el tamaño de gotas generadas como macroemulsiones, para gotas con un tamaño entre 1 y 100 μm , microemulsiones, para gotas entre 10 y 100 nm, y nanoemulsiones para gotas entre 20 a 200 nm. [62]

En este ensayo, se llevaron a cabo diversas pruebas de estabilidad acelerada para evaluar la estabilidad de la emulsión en condiciones extremas. Además, al tratarse de una emulsión gruesa, ya que se preparó de manera simplificada utilizando una licuadora, permite obtener una caracterización preliminar del potencial emulsionante del extracto. Es previsible hallar actividad emulsionante debido a la alta concentración de saponinas del extracto, sin embargo, la evaluación del extracto como agente emulsionante frente a temperaturas extremas, ciclos de temperatura, centrifugación, y tiempo de almacenamiento, permite evaluar la incidencia de estas condiciones en alteraciones

fisicoquímicas. Dado que son condiciones extremas, es esperable una alteración en la estabilidad de la emulsión, ya que estas condiciones son más severas que las observadas en la estabilidad natural o durante la comercialización del producto final. (56)

Tabla 1. Comparativa del diámetro de gota promedio para las condiciones 1, 2 y 3 frente a los diferentes estudios de estabilidad.

| Estudio de estabilidad | C1 (µm) | C2 (µm) | C3 (µm) |
|--|---------|---------|---------|
| Tiempo 0 | 13,56 | 14,00 | 14,11 |
| Tiempo 30 minutos 50 °C | 14,56 | 15,56 | 14,78 |
| Tiempo 30 minutos 75 °C | 15,56 | 16,11 | 13,67 |
| Tiempo 30 minutos Centrifugación | 21,44 | 29,44 | 0,00 |
| Tiempo 72 horas Congelado- Descongelado | 129,67 | 70,50 | 66,63 |
| Tiempo 15 días Temperatura ambiente | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tiempo 30 días Temperatura ambiente | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Para este estudio, las imágenes obtenidas en el microscopio óptico fueron analizadas utilizando el *software ImageJ* donde se midió el diámetro de diversas gotas y luego se realizó un promedio de los diámetros obtenidos para cada condición, que se pueden visualizar en la Tabla 1.

Se ensayaron tres condiciones combinando distintas proporciones del extracto, agua y aceite de oliva, denominadas C1(20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua), C2 (20% de muestra, 5% aceite de oliva, 75% agua) y C3 (10% de muestra, 5% aceite de oliva, 85% agua). Para todas las condiciones se puede observar que el diámetro de las gotas aumentó luego del tiempo 0. Se puede contemplar como el diámetro aumentó para la condición 1 y 2, cuando se expusieron a una temperatura de 50 °C y aumentó aún más cuando se expuso a una temperatura de 70 °C, excepto para la condición 3 que se puede ver una ligera disminución. Teniendo en cuenta que este análisis se realizó de forma manual en base a una imagen y el error que pueda presentar, podría interpretarse de forma que el diámetro se mantuvo constante en ambos estudios para esta condición.

Analizando la respuesta del extracto frente a la centrifugación, se puede visualizar que el diámetro aumentó para las condiciones 1 y 2 en comparación al tiempo 0. El resultado obtenido en la condición 3 puede deberse a que la separación de fases haya sido considerable a tal punto de que cuando se tomó la muestra para analizarla al microscopio, sólo se haya tomado una de las fases y que debido a esto no se visualicen gotas. Para el estudio de congelado y descongelado se puede apreciar un aumento notorio en el diámetro de las gotas para todas las condiciones. En el caso del estudio de estabilidad en el tiempo, tanto para los 15 y 30 días no se visualizaron gotas en el microscopio, esto puede deberse, como se mencionó anteriormente, a una separación de fases.

Comparando los resultados obtenidos para las distintas condiciones, se puede concluir que la condición 2 es la que presenta una mayor estabilidad frente a los distintos estudios realizados. Analizando el diámetro de las gotas se puede determinar que el extracto es capaz de formar macroemulsiones y esto era esperable, ya que al analizar de forma visual las diferentes condiciones las soluciones, se mostraban turbias y bifásicas siendo ambas características de las macroemulsiones. [64]

A pesar de ser un estudio preliminar, los diámetros de las gotas son acorde a los obtenidos en el estudio realizado por Yuxia et. al (2020) en los que la emulsión se realizó con homogeneizadores industriales y se analizó mediante DLS. En dicho estudio, el diámetro de las gotas medido fue de entre 10 y 100 μm , similar a las medidas obtenidas en este ensayo. [65]

Se sugiere realizar un estudio generando las emulsiones con un equipo con mayor fuerza de cizallamiento y realizar un análisis de la emulsión mediante Dynamic Light Scattering (DLS), que, al ser una técnica más robusta, permitirá una medición más precisa del diámetro de las gotas, así como visualizar como los distintos diámetros se distribuyen dentro de la emulsión.

4.13. Evaluación del efecto modulador de actividad de metaloproteasas de los extractos mediante ensayo de Zimograma

Se realizó un zimograma con el fin de evaluar la posible modulación de la actividad metaloproteasa en dos líneas celulares de piel frente a la exposición a M1.

Las metaloproteasas son enzimas proteolíticas que desempeñan un papel crucial en la degradación de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina, fundamentales para la integridad y el aspecto de la piel. Detectar la actividad de metaloproteinasas tales como MMP-2 y MMP-9 en extractos cosméticos es importante para evaluar el envejecimiento cutáneo. [66]

La reducción de la actividad de MMP puede prevenir esta degradación, promoviendo una piel más firme, es por esto por lo que los extractos que inhiben la actividad de MMP son valiosos productos *anti-age*. Igualmente, a la hora de evaluar esta capacidad, es importante también analizar que estos no provoquen un aumento en la actividad de MMP, ya que esto podría generar el efecto contrario y promover el envejecimiento. Conocer el impacto de los extractos cosméticos naturales en la actividad de metaloproteasas es esencial para desarrollar productos seguros y efectivos que promuevan una piel visiblemente saludable y retrasen los signos del envejecimiento, y que funcionen como evidencia para impulsar la producción de compuestos cosméticos innovadores. [67]

El zimograma, es una técnica electroforética que permite identificar distintas enzimas según su peso molecular y su capacidad de degradar sustrato. En este ensayo se copolimeriza el sustrato de las enzimas con poliacrilamida en un gel de SDS-PAGE, luego de que las muestras fueron separadas se reemplaza el SDS por un detergente no iónico como el Tritón X-100 que permite que las muestras se re naturalicen y activen. Cuando el gel se incuba en buffer para metaloproteasas estas degradan el sustrato del gel que luego es visible gracias a la ausencia de tinción en la zona de degradación. [68] Este es uno de los métodos más sensibles y confiables para estudiar la actividad proteolítica de las MMP, ya que permite distinguir la forma activa y latente de diferentes MMP en función de su peso molecular. Esta técnica posee distintas ventajas, tales como, poder detectar cantidades muy pequeñas de la enzima, su simplicidad y bajo costo. [69] Al utilizar gelatina como sustrato, se puede detectar la presencia de MMP-2 y MMP-9 que pertenecen al grupo de metaloproteasas y gelatinasas, degradan colágenos tipo IV, V, VII, X y elastina, las mismas presentan pesos moleculares de 72 kDa y 92 kDa respectivamente. [70]

En el presente estudio se realizó un zimograma y un SDS-PAGE con el fin de comparar entre ambos resultados la presencia de proteínas y analizar su actividad degradativa, y a

su vez evaluar como la exposición al extracto estudiado en este proyecto, puede potencialmente inhibir esta actividad. Los resultados de zimograma y SDS-PAGE para la muestra M1 se muestran en la Figura 15 donde se puede observar la presencia de una banda en todas las muestras que debido a su peso molecular podría ser MMP-9. En los carriles 2 y 3 se puede observar una pequeña diferencia de intensidad entre la banda con y sin tratamiento, lo que podría indicar una disminución en la actividad de esta metaloproteína por su exposición al extracto, esto se podría verificar realizando un análisis semi-cuantitativo, midiendo la intensidad de las bandas mediante un software de análisis de imágenes, como *ImageJ*, para determinar estadísticamente si la diferencia es significativa. En los carriles restantes se puede ver como no existe una diferencia visualmente notoria entre la banda de los carriles con tratamiento y los carriles sin tratamiento, lo que podría indicar que el compuesto en este caso no disminuyó la actividad de metaloproteasas, pero tampoco la aumentó. También se pueden observar del carril 2 al 5, una banda muy tenue por debajo de la banda presuntamente correspondiente a MMP-9 (82 kDa) que podría ser de MMP-2 (62 kDa). [71]

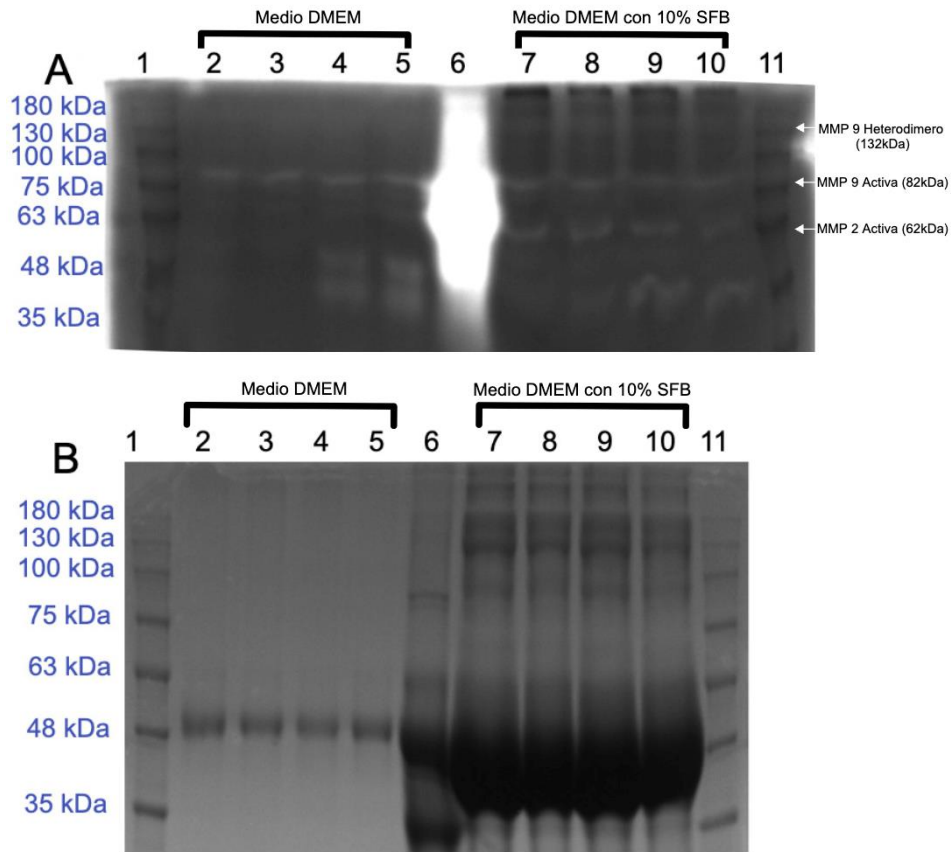


Figura 15. A) Zimograma con tinción Coomassie. B) SDS-PAGE.

Carril 1 - Marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder. Carril 2 - Sobrenadante de la línea celular HaCaT tratado con M1 dilución 1/64 en medio DMEM sin SFB. Carril 3 - Sobrenadante de la línea celular HaCaT sin tratamiento. Carril 4 - Sobrenadante de la línea celular HDF1 tratado con M1 dilución 1/64 Carril 5 - Sobrenadante de la línea celular HDF1 sin tratamiento Carril 6 - Colagenasa. Carril 7 - Sobrenadante de la línea celular HaCaT tratado con M1 dilución 1/64 Carril 8 - Sobrenadante de la línea celular HaCaT sin tratamiento Carril 9 - Sobrenadante de la línea celular HDF1 tratado con M1 dilución 1/64 Carril 10 - Sobrenadante de la línea celular HDF1 sin tratamiento Carril 11 - Marcador de peso molecular

Por otro lado, se pueden apreciar del carril 7 al 10, bandas claras a la altura de 62 kDa que corresponden al peso molecular de MMP-2, que al evidenciarse con mejor definición en las muestras con SFB, podría deberse a que el suero contiene metaloproteasas y que a su vez posee diversos factores de crecimiento y hormonas que podrían aumentar la expresión de las mismas. [72] Se realizó la corrida de muestras con y sin suero con el fin de poder comparar las metaloproteasas inherentes a las líneas celulares a diferencia de las que se encuentran en el suero o que aumentan su actividad en presencia de este y de esa forma poder comparar la acción del extracto en las distintas muestras.

Adicionalmente en la parte inferior del gel para los carriles 4, 5, 9 y 10, se evidencian bandas que solo están presentes en la línea celular HDF1, estas podrían ser metaloproteasas que se expresan de forma intrínseca en HDF1 ya que se observan en los carriles con y sin tratamiento. Sin embargo, ese peso molecular no corresponde a ninguna de las metaloproteasas que se pueden analizar con esta técnica, esto podría explicarse si otras metaloproteasas no tuviesen alta especificidad por su sustrato, lo que les permita degradar otras proteínas en común con MMP-2 y MMP-9, como gelatina en este caso. [73] Estas bandas por su peso molecular podrían ser de MMP-19 que posee un peso molecular de 45 kDa en su forma activa, y tiene como sustrato gelatina, pero no se encontró evidencia bibliográfica que respalde una expresión diferencial de esta metaloproteasa en la línea HDF1 y HaCaT. [70]

Con el fin de obtener una imagen más completa de las proteínas presentes en las muestras se realizó un SDS-PAGE, lo que permite comparar con el zimograma qué proteínas están presentes y cuales son funcionalmente activas. Observando la Figura 15. B se puede apreciar como las bandas visibles en la Figura 15. A no se aprecian en los primeros carriles de muestra tratada con medio sin suero, esto puede deberse a que se encuentran en baja concentración para ser visibles por esta técnica, pero si se visualizan en el zimograma ya que es una técnica más sensible en este aspecto. Por otro lado, se aprecian múltiples bandas en los carriles de muestras con medio DMEM con 10% SFB, esto se debe a la presencia de diversos compuestos presentes en el suero como se mencionó anteriormente.

A futuro, se podrían co-cultivar ambas líneas celulares para evaluar la actividad de metaloproteasas, ya que se ha comprobado científicamente que las interacciones epidérmicas modulan la expresión de estas proteínas. Este enfoque permitiría investigar si el extracto M1 tiene un efecto modulador adicional sobre la actividad de metaloproteasas en un entorno que simule mejor las condiciones naturales de la piel, proporcionando así una evaluación más precisa de su potencial cosmético. [74]

4.14. Cultivos Celulares

Se generó un banco de trabajo para las líneas celulares HDF1 y HaCat de forma exitosa, de manera que se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad y evaluación de la capacidad fotoprotectora frente a exposición UV del compuesto.

En la evaluación de citotoxicidad del compuesto M1 se utilizó la línea celular HDF1 debido a su rol esencial en la formación y mantenimiento del tejido conectivo. Estas células son responsables de sintetizar y mantener la matriz extracelular, produciendo proteínas clave como colágeno, elastina y fibronectina. Los fibroblastos, presentes en la dermis, tendones, ligamentos, tejido adiposo y alrededor de órganos y vasos sanguíneos, se activan en respuesta a lesiones para sintetizar nueva matriz extracelular y reparar tejidos, siendo cruciales para la cicatrización y regeneración. [75]

Para el estudio de la capacidad fotoprotectora frente a exposición UV también se empleó HDF1 ya que estas células expuestas a estrés oxidativo nos permiten evidenciar si debido a factores ambientales como la radiación, las células pueden experimentar daño celular y envejecimiento prematuro. Al utilizarlos como modelo de prueba, se puede identificar y cuantificar los efectos del compuesto en estudio sobre la síntesis de colágeno y elastina, evaluar la capacidad antioxidante del mismo y su protección contra el estrés oxidativo, medir la proliferación y viabilidad celular, y estudiar el potencial del compuesto para mejorar la cicatrización de heridas y la salud general de la piel. [76]

La segunda línea celular utilizada en el estudio de citotoxicidad del compuesto M1 fueron las HaCaT, estas son queratinocitos humanos inmortalizados derivados de piel de adulto normal. Tienen la capacidad de dividirse indefinidamente en cultivo y además, pueden diferenciarse y formar estratos epidérmicos similares a los encontrados en la piel humana in vivo cuando se cultivan en condiciones adecuadas. Aunque las HaCaT son genéticamente estables, presentan algunas mutaciones, como en el gen p53, que contribuyen a su inmortalidad. [77]

Estas células son sensibles a diversos estímulos externos como radiación UV, productos químicos y compuestos bioactivos, lo que las hace ideales para estudios de toxicología, cáncer de piel y mecanismos de reparación celular. Además, la exposición de HaCaT a

radiación UV permite investigar los efectos del daño solar, los mecanismos de reparación del ADN y la eficacia de compuestos fotoprotectores. En el ámbito de la dermatología y cosmética, se utilizan para evaluar la citotoxicidad y eficacia de productos dermatológicos y cosméticos, incluyendo compuestos *anti-age* y antioxidantes. [78]

4.15. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares no tumorales

En el presente estudio se realizó el ensayo de cristal violeta ya que es una técnica utilizada para evaluar la citotoxicidad celular, es una sal catiónica cuyos iones positivos interactúan con las cargas negativas de los componentes celulares como el ADN y las proteínas. Estas interacciones electrostáticas permiten que el cristal violeta se una firmemente a las células, tiñéndolas de un color violeta intenso. Esta unión específica es crucial para diferenciar las células viables adheridas del medio circundante. [79]

Respecto a los resultados obtenidos en el ensayo para la línea celular HDF1, se pueden visualizar en la Figura 16, donde se evidencia que la viabilidad celular se mantuvo en todos los casos mayor al 50 % con el extracto M1 aplicado a los fibroblastos en diferentes concentraciones.

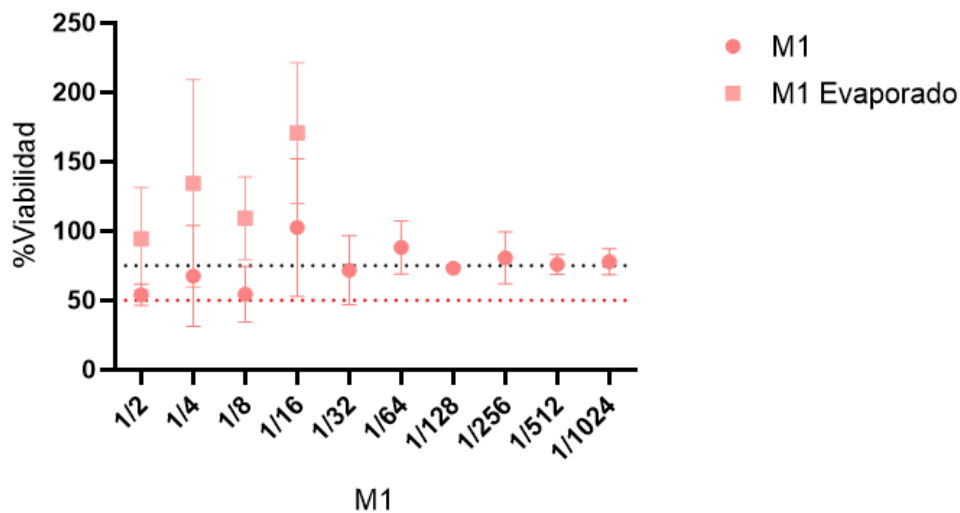


Figura 16. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de M1 en la línea celular HDF1. Porcentaje de viabilidad celular de las células HDF1 en función la dilución del complejo M1 luego de un tratamiento de 24 horas con el mismo.

En las primeras 3 diluciones ensayadas se observó que la viabilidad no superó el 75%, por tanto, se puede considerar que a esas concentraciones el compuesto es ligeramente citotóxico. [80] De la dilución 1/16 en adelante se observó un porcentaje de viabilidad mayor al 75% en todos los casos, esto indicaría que a dichas concentraciones el compuesto se comporta como no citotóxico para la línea celular empleada. [80]

El patrón de respuesta celular no reflejó el típico comportamiento dosis respuesta entre la concentración del compuesto botánico y la viabilidad celular a las diluciones ensayadas, a partir de la dilución 1/16 no hay variación de la respuesta a pesar de que se varíe la dosis. El leve efecto citotóxico observado en las diluciones 1/2, 1/4 y 1/8 podría deberse al efecto del solvente etanol sobre las líneas celulares.

De acuerdo a lo reportado por Kar et al. (2021), el etanol afecta negativamente la viabilidad y función de los fibroblastos al inducir estrés oxidativo y apoptosis. A concentraciones superiores al 1%, disminuye la proliferación, altera la síntesis de colágeno y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), comprometiendo la integridad celular y la capacidad regenerativa. [81]

Por lo antes expuesto, en el diseño del experimento se incluyó un paso de evaporación para evaluar las primeras 4 diluciones del extracto libres de etanol. Tal como se observa en la Figura 16, en todos los casos la viabilidad se mantiene mayor al 75% y en algunos casos, como la concentración 1/16, superando el 100% de viabilidad.

A su vez, el aumento en la viabilidad celular observado comparando el extracto sin y con vehículo, demostró que el etanol disminuyó la viabilidad celular en las concentraciones ensayadas para esta línea celular.

Tal como se demostró en el ensayo de actividad antimicrobiana descrito en la sección 4.9., la dilución 1/5 del extracto M1 presentó efecto antimicrobiano frente a *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad, a futuro se podría evaluar la capacidad antimicrobiana del compuesto M1 para las concentraciones 1/8 y 1/16, ya que el compuesto parece potenciar la proliferación celular a una concentración 1/16 y a su vez presenta actividad antimicrobiana en dicha concentración.

Respecto a los resultados obtenidos en el ensayo para la línea celular HaCat, se pueden visualizar en la Figura 17 que para las diluciones 1/2 y 1/4 de M1, se observa una significativa reducción en la viabilidad celular, registrando valores del 15% y 40%, respectivamente.

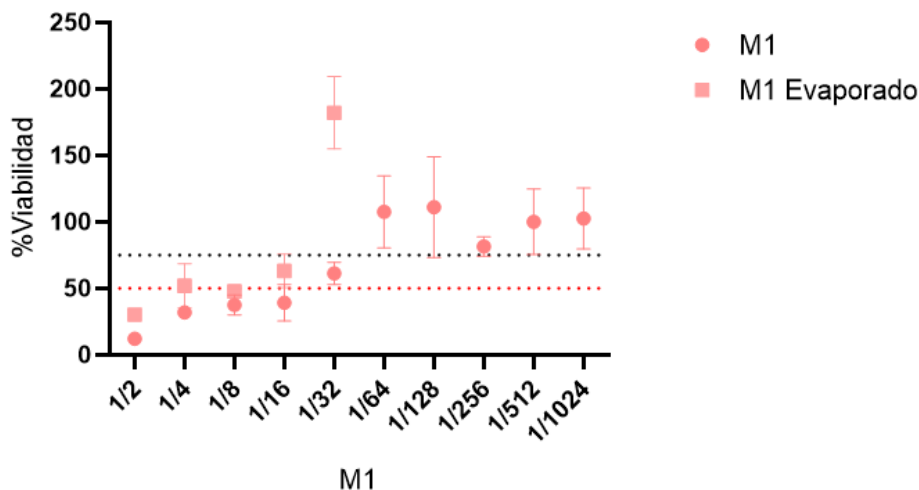


Figura 17. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de M1 en la línea celular HaCat. Porcentaje de viabilidad celular de las células HaCat en función la dilución del complejo M1 luego de un tratamiento de 24 horas con el mismo.

Estos resultados sugieren que el compuesto tiene un efecto citotóxico considerable a estas concentraciones para la línea celular HaCat, afectando negativamente la capacidad de las células para mantener su viabilidad.

En concentraciones entre 1/8 y 1/16, se observa una viabilidad celular del 45%, lo que indica que el efecto citotóxico del compuesto se mantiene, aunque la viabilidad no disminuye aún más en comparación con las concentraciones más altas.

A partir de la concentración 1/64, se registró un incremento en la viabilidad celular por encima del 100%, esto evidencia que el compuesto no es citotóxico a estas concentraciones en las condiciones ensayadas y sugiere que el compuesto M1 podría tener efectos estimulantes del crecimiento celular para dichas concentraciones.

Por los resultados obtenidos, se realizó un análisis dosis-respuesta para observar cómo varía la respuesta celular en función de diferentes concentraciones del compuesto

evaluado. En el contexto del estudio realizado, donde se observan resultados variados de viabilidad celular para diferentes diluciones, este análisis es fundamental para determinar con precisión el rango de concentraciones en el cual el compuesto muestra efectos citotóxicos, estimulantes o neutros.

Por un lado, identificar las concentraciones donde se observa una reducción significativa en la viabilidad celular, como en las diluciones 1/2 y 1/4, ayuda a establecer los límites de seguridad y las dosis potencialmente tóxicas del compuesto. Estos datos son cruciales para evaluar los riesgos asociados con su uso y para desarrollar estrategias de mitigación de posibles efectos adversos en aplicaciones terapéuticas o cosméticas.

Las concentraciones donde se registra una viabilidad celular superior al 100%, como en las diluciones 1/64 y 1/128, sugieren la posibilidad de que el compuesto M1 tenga efectos estimulantes del crecimiento celular. Este análisis permite profundizar investigando los mecanismos subyacentes detrás de estos efectos y determinando si estos podrían ser beneficiosos en aplicaciones específicas, como en la promoción de la regeneración celular o en la mejora de la salud cutánea.

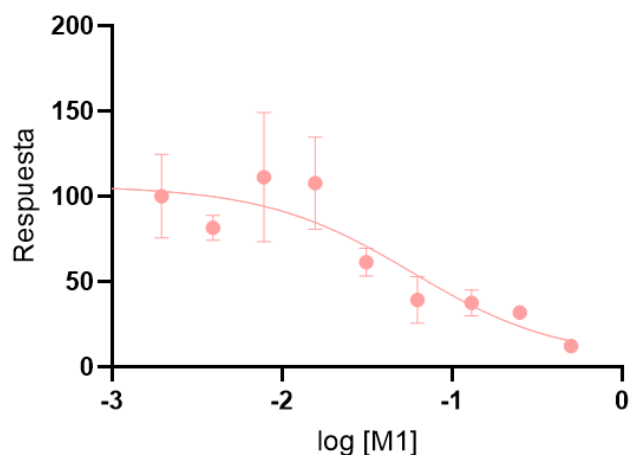


Figura 18. Curva Dosis – Respuesta de las diluciones del compuesto M1 frente a la línea celular HaCaT. Muestra la relación entre la concentración de un compuesto (en escala logarítmica) y la respuesta biológica observada en términos de viabilidad celular.

La curva dosis-respuesta presentada en la Figura 18 para la línea celular HaCaT, muestra la relación entre la concentración de un compuesto (en escala logarítmica) y la respuesta

biológica observada en términos de viabilidad celular. A medida que la concentración del compuesto aumenta, la viabilidad celular disminuye, lo que indica un efecto citotóxico dependiente de la dosis.

La curva tiene una forma sigmoide típica de ensayos de citotoxicidad, lo que sugiere que el compuesto tiene un umbral de concentración por debajo del cual su efecto es mínimo o nulo y por encima del cual la viabilidad celular se reduce significativamente.

El valor de EC50 (concentración efectiva media) es una medida crítica en estos ensayos, representando la concentración del compuesto a la cual se observa el 50% de la respuesta máxima. En este caso, el EC50 es de 0,05, lo que indica que para la dilución 1/20 la viabilidad celular se reduce al 50% de la máxima observada.

4.16. Evaluación de la capacidad fotoprotectora frente a exposición UV

La técnica del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) se utiliza ampliamente para evaluar el daño celular inducido por radiación UV y otros agentes estresantes en estudios de toxicología y biología celular. Este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas para reducir el compuesto MTT a un producto formazán insoluble en agua, que puede ser cuantificado espectrofotométricamente para estimar la viabilidad celular. Cuando las células son sometidas a daño por radiación UV, la capacidad de reducción del MTT puede disminuir debido a la muerte celular, daño al metabolismo celular o inhibición de la actividad enzimática necesaria para la conversión del MTT. [82]

En el presente estudio, se decide emplear el método mencionado anteriormente con dos líneas celulares diferentes para evaluar el efecto del complejo frente a la exposición a UV. A su vez, el diseño del experimento se basó en el ensayo de citotoxicidad utilizando diluciones que tengan una viabilidad mayor al 75%, de esta manera se evita que el compuesto genere un efecto citotóxico sobre las células. Cabe destacar que se realizó una puesta a punto del ensayo, variando diferentes parámetros como la cantidad de células por pocillo, los tiempos de exposición al compuesto y a la radiación UV.

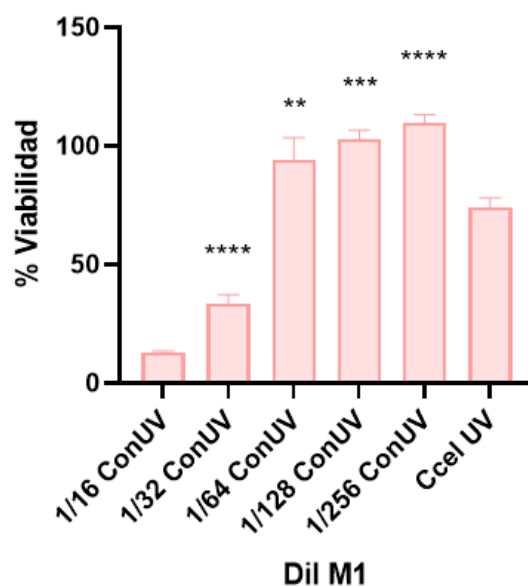


Figura 19. Evaluación del efecto fotoprotector de M1 en la línea celular HDF1 frente a la exposición a UV. Las barras representan la viabilidad promedio de 3 determinaciones y los valores fueron normalizados frente al control de células sin exponer. 1/16 ConUV: dilución 1/16 de M1 en HDF1 expuestas a UV, 1/32 ConUV: dilución 1/32 de M1 en HDF1 expuestas a UV, 1/64 ConUV: dilución 1/64 de M1 en HDF1 expuestas a UV, 1/128 ConUV: dilución 1/128 de M1 en HDF1 expuestas a UV, 1/256 ConUV: dilución 1/256 de M1 en HDF1 expuestas a UV, Ccel UV: células HDF1 expuestas a UV, Ccel SinUv: células HDF1 no expuestas a UV. Se analizaron los datos y presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk. Luego fueron analizados mediante la técnica de One-Way ANOVA y la prueba de comparaciones de Dunnet con el control de células, ****, ** y **** representan diferencias significativas con $p < 0,0001$, $p = 0,0059$, $p = 0,0003$ y $p < 0,0001$ respectivamente. $n = 3$ repetidos por cada condición.

En la Figura 19 se puede observar que el tratamiento de los fibroblastos con M1 para protegerlos frente al daño UV, ha mostrado que aquellas células tratadas con el compuesto en las diluciones 1/64, 1/128 y 1/256, con un porcentaje de viabilidad del 90%, 100% y 110% respectivamente, presentan diferencias significativas en comparación con el control de células tratadas (75%). Este resultado sugiere que el compuesto no solo protege a las células del daño UV en las diluciones 1/64 y 1/128, sino que también promueve su proliferación en la dilución 1/256. Para las diluciones 1/16 y 1/32 no se visualiza protección y según en el ensayo de citotoxicidad previo, se observa que el compuesto podría ser levemente citotóxico, por lo que sumada la exposición UV, esto podría disminuir la viabilidad celular tal como se representa en la Figura 19.

El compuesto M1 demostró en ensayos anteriores tener capacidad antioxidante, por lo que actuaría neutralizando los radicales libres generados por la radiación UV, que de otro

modo causarían daño en el ADN, lípidos y proteínas celulares, llevando a la apoptosis. [83]

A su vez, el compuesto M1 podría presentar propiedades *anti-age* por su capacidad para estimular la proliferación celular. Los ingredientes con esta propiedad contienen factores de crecimiento y péptidos que activan vías celulares responsables de la síntesis de colágeno y elastina, esenciales para mantener la firmeza y elasticidad de la piel. [83]

La mayor proliferación celular observada en las diluciones mencionadas indica que el compuesto podría promover la regeneración celular y la reparación tisular, lo cual es fundamental para contrarrestar los efectos dañinos de la radiación UV.

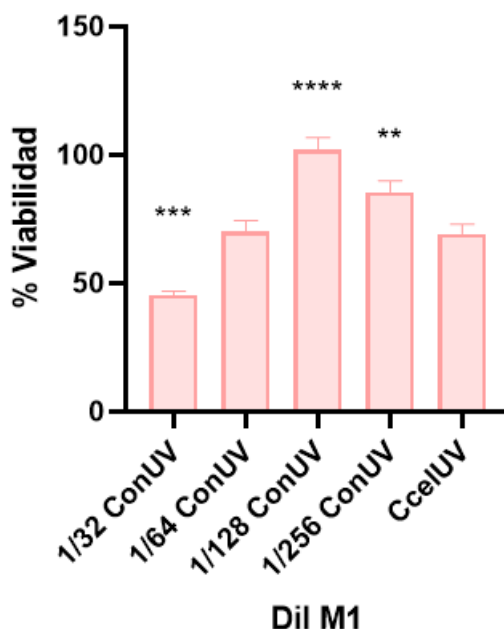


Figura 20. Evaluación del efecto fotoprotector de M1 en la línea celular HaCat frente a la exposición a UV. Las barras representan la viabilidad promedio de 3 determinaciones y los valores fueron normalizados frente al control de células sin exponer. 1/64 ConUV: dilución 1/64 de M1 en HaCat expuestas a UV, 1/128 ConUV: dilución 1/128 de M1 en HaCat expuestas a UV, 1/256 ConUV: dilución 1/256 de M1 en HaCat expuestas a UV, Ccel UV: células HaCat expuestas a UV, Ccel SinUv: células HaCat no expuestas a UV. Se analizaron los datos y presentaron una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk. Luego fueron analizados mediante la técnica de One-Way ANOVA y la prueba de comparaciones de Dunnet con el control de células, **** y ** representan diferencias significativas con $p < 0,0001$ y $p = 0,0016$ respectivamente. $n = 3$ repetidos por cada condición.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo visualizados en la Figura 20, revelaron que frente a una dilución 1/64 del compuesto M1, las células HaCat tratadas mantuvieron

una viabilidad del 60% al igual que el control de células no tratadas. La viabilidad aumentó notablemente a un 90% en la dilución 1/128 y disminuyó a un 75% en la dilución 1/256. Frente a la dilución 1/32 no se visualiza protección y según en el ensayo de citotoxicidad previo, se observa que el compuesto podría ser levemente citotóxico, por lo que sumada la exposición UV, esto podría disminuir la viabilidad celular tal como se representa en la Figura 20.

Si bien el compuesto logra proteger a la línea celular frente al daño UV, no logra generar una proliferación celular como con la línea celular de fibroblastos.

La diferencia en la capacidad de estimular la proliferación celular entre las células HaCat y los fibroblastos frente al compuesto M1 podría deberse a las características intrínsecas y funcionales únicas de cada tipo celular. Los fibroblastos son células que desempeñan un papel crucial en la síntesis de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina, esenciales para la estructura y elasticidad de la piel. Como resultado, los compuestos diseñados para promover la regeneración de la piel y la producción de colágeno pueden tener un efecto más pronunciado en las células fibroblásticas, estimulando su proliferación y actividad metabólica de manera más eficaz. [84]

Por otro lado, HaCat es una línea celular diferenciada derivada de queratinocitos, tienen una función principal en la formación de la barrera protectora de la piel y en la diferenciación hacia células córneas. Aunque también son sensibles al daño UV y se benefician de la protección antioxidante, su respuesta biológica puede diferir de la de los fibroblastos en términos de cómo perciben y utilizan los estímulos para la proliferación celular. Los queratinocitos están más enfocados en mantener la integridad y función de la barrera cutánea, por lo que pueden no responder de la misma manera que los fibroblastos a los compuestos diseñados para activar procesos de reparación y regeneración dérmica profunda. [76]

Además, las vías de señalización y los receptores celulares involucrados en la respuesta a factores de crecimiento y antioxidantes pueden variar entre células, lo que podría influir en la capacidad del compuesto para estimular la proliferación celular. Los estudios han demostrado que los fibroblastos tienen una mayor plasticidad y capacidad de respuesta a estímulos exógenos, como los compuestos cosméticos, debido a su naturaleza activa en

la producción y remodelación de la matriz extracelular en la piel en comparación con otros tipos celulares como los queratinocitos. [76]

5. Conclusiones

Este estudio exploró la producción de un complejo multifuncional con propiedades emulsionantes, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, *anti-age* y regeneradoras, utilizando extractos de *Chenopodium quinoa*, *Avena sativa*, y *Calendula officinalis*. Después de evaluar varias combinaciones de extracción, la muestra M1, compuesta por 50% de extracto de caléndula, 30% de quinoa y 20% de avena, mostró ser la más prometedora.

En base a los objetivos determinados para este trabajo, se logró desarrollar una metodología de extracción de moléculas bioactivas para las plantas seleccionadas. Cumpliendo con segundo objetivo, se logró caracterizar al complejo generado (M1) el cual presentó una alta concentración de polifenoles de 140 mg EAG/mL y saponinas de 4,6 mg EE/mL, así como una notable capacidad antioxidante de 280.000 µg EAA/mL y capacidad antimicrobiana frente a *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Además, demostró ser eficaz en la formación de macroemulsiones. Con la finalidad de cumplir el último objetivo, en el ensayo de citotoxicidad se evidenció que el compuesto diluido al 1% no afecta la viabilidad celular de las células HDF1, sino que incluso promueve la proliferación para la línea celular HaCat, y respecto a la protección frente al daño UV, se puede observar que el compuesto diluido al 1% en las células HDF1 tiene efecto fotoprotector. El ensayo de zimograma no mostró cambios en la modulación de la actividad de las metaloproteasas.

En conclusión, M1 ofrece un prometedor potencial para aplicaciones biocosméticas, combinando eficacia y sostenibilidad. El complejo no solo contribuye de a la formulación de un cosmético, al proporcionar un potencial emulsionante, capacidad conservante y estabilizante evidenciados, sino que también ofrece principios activos altamente valiosos para la funcionalidad del producto, actuando como antioxidante y agente *anti-age*.

6. Referencias bibliográficas

- [1] C. Barros, R. Bevenuto, and G. Barros, “Natural and Organic Cosmetics: Definition and Concepts,” 2020, doi: 10.4172/2471-9323.1000143.
- [2] B. Fonseca-Santos, M. Antonio Corrêa, and M. Chorilli, “Sustainability, natural and organic cosmetics: Consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations,” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 51, no. 1, pp. 17–26, Jan. 2015, doi: 10.1590/S1984-82502015000100002.
- [3] Grand View Research, “Informe sobre el tamaño, la participación y el crecimiento del mercado de cosméticos en 2030,” *grandviewresearch*, 2023.
- [4] Statista, “Natural Cosmetics - Worldwide,” Natural Cosmetics - Worldwide.
- [5] Ministerio de Salud Pública, “Cosmetovigilancia,” Cosmetovigilancia.
- [6] FDA, “Cosmetics Guidance & Regulation,” Cosmetics Guidance & Regulation.
- [7] F. Chemat, M. A. Vian, and G. Cravotto, “Green extraction of natural products: Concept and principles,” 2012, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms13078615.
- [8] M. A. Pastor-Nieto *et al.*, “Conservantes en productos de higiene y cosméticos, medicamentos tópicos y productos de limpieza doméstica en España,” *Actas Dermosifiliogr*, vol. 108, no. 8, pp. 758–770, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.ad.2017.04.003.
- [9] J. Muñoz and M. del Carmen Alfaro Isabel Zapata, “Avances en la formulación de emulsiones,” 2007.
- [10] C. Castaño Amores and P. J. Hernández Benavides, “Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento,” *Ars Pharmaceutica (Internet)*, vol. 59, no. 2, Jun. 2018, doi: 10.30827/ars.v59i2.7218.
- [11] * Gissel, I. C. Ramos, and D. Alcalá Pérez, “Antioxidants in Dermatology,” 2010.

- [12] A. Farmacéutica Mexicana, A. México Silva-Flores, P. Giovanna, S. Arturo, and L. Alejandro, “Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas,” *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 48, no. 2, pp. 7–15, 2017, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956615002>
- [13] K. A. Reynertson *et al.*, “Anti-Inflammatory Activities of Colloidal Oatmeal (*Avena sativa*) Contribute to the Effectiveness of Oats in Treatment of Itch Associated With Dry, Irritated Skin,” 2015.
- [14] M. A. Bernards, D. A. Ivanov, M. A. Neculai, and R. W. Nicol, “Ginsenosides: Phytoanticipins or Host Recognition Factors?,” in *The Biological Activity of Phytochemicals*, Springer New York, 2011, pp. 13–32. doi: 10.1007/978-1-4419-7299-6_2.
- [15] M. Meydani, “Potential health benefits of avenanthramides of oats,” Dec. 2009. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00256.x.
- [16] D. Silva, M. S. Ferreira, J. M. Sousa-Lobo, M. T. Cruz, and I. F. Almeida, “Anti-inflammatory activity of calendula officinalis l. Flower extract,” *Cosmetics*, vol. 8, no. 2, 2021, doi: 10.3390/cosmetics8020031.
- [17] A. Raal and K. Kirsipuu, “Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia,” *Nat Prod Res*, vol. 25, no. 6, pp. 658–662, Mar. 2011, doi: 10.1080/14786419.2010.528417.
- [18] Y. Tang, X. Li, B. Zhang, P. X. Chen, R. Liu, and R. Tsao, “Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes,” *Food Chem*, vol. 166, pp. 380–388, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.018.
- [19] A. Ahumada, A. Ortega, D. Chito, and R. Benítez, “Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico,” *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 45, no. 3, pp. 438–469, Sep. 2016, doi: 10.15446/rcciquifa.v45n3.62043.

- [20] J. G. Lim, H. M. Park, and K. S. Yoon, “Analysis of saponin composition and comparison of the antioxidant activity of various parts of the quinoa plant (*Chenopodium quinoa* Willd.),” *Food Sci Nutr*, vol. 8, no. 1, pp. 694–702, Jan. 2020, doi: 10.1002/fsn3.1358.
- [21] R. A. Carciochi, G. D. Manrique, and K. Dimitrov, “Changes in phenolic composition and antioxidant activity during germination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.),” *Faculty of Engineering, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires*, 2013.
- [22] S. Dong, X. Yang, L. Zhao, F. Zhang, Z. Hou, and P. Xue, “Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria,” *Ind Crops Prod*, vol. 149, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112350.
- [23] K. Mietlińska, “Biotechnology and Food Science Polyphenols and saponins-properties and application in cosmetics,” 2022.
- [24] S. Rai, E. Acharya-Siwakoti, A. Kafle, H. P. Devkota, and A. Bhattarai, “Plant-Derived Saponins: A Review of Their Surfactant Properties and Applications,” Dec. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/sci3040044.
- [25] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, “Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2,” 2004. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/79/5/727/4690182>
- [26] A. Scalbert, I. T. Johnson, and M. Saltmarsh, “Polyphenols: antioxidants and beyond 1-3,” 2005. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/81/1/215S/4607494>
- [27] E. Toscano, M. Inocente, B. Loja, O. Mishti, E. Guiop, and P. Garrido, “Cuantificación de flavonoides en una bebida mixta de quinoa, kañiwa y kiwicha,” 2014.
- [28] M. S. Mora-Ocación, A. C. Morillo-Coronado, and E. H. Manjarres-Hernández, “Extraction and Quantification of Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa*

- Willd.) Genotypes from Colombia,” *Int J Food Sci*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/7287487.
- [29] A. V. Le, S. E. Parks, M. H. Nguyen, and P. D. Roach, “Improving the Vanillin-Sulphuric Acid Method for Quantifying Total Saponins,” *Technologies (Basel)*, vol. 6, no. 3, Sep. 2018, doi: 10.3390/technologies6030084.
- [30] L. Smolskait, P. R. Venskutonis, and T. Talou, “Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species,” *LWT*, vol. 60, no. 1, pp. 462–471, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2014.08.007.
- [31] N. J. Miller’, C. Rice-Evans, M. 1 Davies2, V. Gopinathan’, and A. Milner’, “A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates,” 1993.
- [32] Larrea-posadas, “TFM JAVIER LARREA,” 2012.
- [33] T. Ralla, H. Salminen, M. Edelmann, C. Dawid, T. Hofmann, and J. Weiss, “Oat bran extract (*Avena sativa* L.) from food by-product streams as new natural emulsifier,” *Food Hydrocoll*, vol. 81, pp. 253–262, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.02.035.
- [34] “Primary Epidermal Keratinocytes; Normal, Human, Adult (HEKa) PCS-200-011™.” [Online]. Available: www.atcc.org
- [35] “Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult (HDFa).” [Online]. Available: www.atcc.org
- [36] Laboratorio de Biotecnología Universidad ORT Uruguay, “Introducción al laboratorio de Cultivos Celulares,” 2023.
- [37] S. De Arteaga and A. Lapidó, “Obtención de aminoácidos tipo micospolina provenientes de microalgas y evaluación in vitro del efecto protector sobre queratinocitos humanos expuestos a radiación ultravioleta,” 2023.

- [38] Z. Ren, J. Chen, and R. A. Khalil, “Zymography as a research tool in the study of matrix metalloproteinase inhibitors,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1626, Humana Press Inc., 2017, pp. 79–102. doi: 10.1007/978-1-4939-7111-4_8.
- [39] K. G. O. Bezerra, R. D. Rufino, J. M. Luna, and L. A. Sarubbo, “Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics,” Nov. 01, 2018, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/btpr.2682.
- [40] I. Góral and K. Wojciechowski, “Surface activity and foaming properties of saponin-rich plants extracts,” May 01, 2020, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.cis.2020.102145.
- [41] N. León-Roque, S. Aguilar-Tuesta, J. Quispe-Neyra, W. Mamani-Navarro, S. Alfaro-Cruz, and L. Condezo-Hoyos, “A green analytical assay for the quantitation of the total saponins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) based on macro lens-coupled smartphone,” *Talanta*, vol. 204, pp. 576–585, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.014.
- [42] D. Kregiel *et al.*, “Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants,” in *Application and Characterization of Surfactants*, InTech, 2017. doi: 10.5772/68062.
- [43] R. Tsao, “Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols,” 2010, *MDPI AG*. doi: 10.3390/nu2121231.
- [44] C. Y. Cheok, H. A. K. Salman, and R. Sulaiman, “Extraction and quantification of saponins: A review,” May 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.057.
- [45] E. Vidal-Ollivier, G. Balansard, R. Faure, and A. Babadjamian+, “REVISED STRUCTURES OF TRITERPENOID SAPONINS FROM THE FLOWERS OF CALENDULA OFFICINALIS,” 1989.
- [46] E. De Bioquímica, Y. Farmacia, and P. Por, “ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS TESIS DE GRADO PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO.”

- [47] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, “52 POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS [14] [14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent,” 1999.
- [48] C.-Y. O. Chen, P. E. Milbury, F. W. Collins, and J. B. Blumberg, “The Journal of Nutrition Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions Avenanthramides Are Bioavailable and Have Antioxidant Activity in Humans after Acute Consumption of an Enriched Mixture from Oats 1,2,” 2007. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/137/6/1375/4664754>
- [49] D. Cruceriu, O. Balacescu, and E. Rakosy, “Calendula officinalis: Potential Roles in Cancer Treatment and Palliative Care,” Dec. 01, 2018, *SAGE Publications Inc.* doi: 10.1177/1534735418803766.
- [50] V. C. K. N. Deuschle *et al.*, “Avaliação fitoquímica e capacidade antioxidante e fotoprotetora in vitro das folhas de Calendula officinalis L.,” *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 17, no. 4, pp. 693–701, 2015, doi: 10.1590/1983-084X/14_055.
- [51] R. Pandel, B. Poljšak, A. Godic, and R. Dahmane, “Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention,” *ISRN Dermatol*, vol. 2013, pp. 1–11, Sep. 2013, doi: 10.1155/2013/930164.
- [52] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” Mar. 23, 2005. doi: 10.1021/jf030723c.
- [53] G. Ak *et al.*, “A comparative bio-evaluation and chemical profiles of Calendula officinalis L. extracts prepared via different extraction techniques,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 10, no. 17, Sep. 2020, doi: 10.3390/app10175920.
- [54] M. D. Lundov and C. Zachariae, “Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008,” 2008. [Online]. Available: <http://ec.europa.eu/rapex>

- [55] E. Cervantes-García, R. García-González, and P. María Salazar-Schettino, “Características generales del Staphylococcus aureus,” 2014. [Online]. Available: www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
- [56] US Pharmacopeia, “Microbiological Examination Of Nonsterile Products,” *US Pharmacopeia*, 2016.
- [57] International Organization for Standardization, “ISO 17516,” 2014.
- [58] L. Liset, M. M. Panizo, G. Ferrara, and V. Reviakina, “Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en especies del género Fusarium,” *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2012.
- [59] R. L. Faria *et al.*, “Antimicrobial activity of Calendula officinalis, Camellia sinensis and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars,” *Scielo*, 2009.
- [60] F. Calvo, J. M. Gómez, L. Ricardez-Sandoval, and O. Alvarez, “Integrated design of emulsified cosmetic products: A review,” Sep. 01, 2020, *Institution of Chemical Engineers*. doi: 10.1016/j.cherd.2020.07.014.
- [61] U. Tiwari, N. G. Ganesan, J. Junnarkar, and V. Rangarajan, “Toward the formulation of bio-cosmetic nanoemulsions: from plant-derived to microbial-derived ingredients,” *J Dispers Sci Technol*, vol. 43, no. 7, pp. 1061–1078, 2022, doi: 10.1080/01932691.2020.1847664.
- [62] T. B. Schreiner, M. M. Dias, M. F. Barreiro, and S. P. Pinho, “Saponins as Natural Emulsifiers for Nanoemulsions,” Jun. 08, 2022, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jafc.1c07893.
- [63] J. Pablo Díaz-Castillo, H. Jhoana Mier Giraldo, M. Fernando Sánchez, G. Nuñez Hernandez, C. Lucia Camargo Gómez, and L. Janneth Moyano Bonilla Profesional Especializado, *Estudios de estabilidad de productos cosméticos Recomendaciones para el desarrollo de Supervisión y coordinación: Programa de Calidad para el Sector Cosméticos-Safe+*. Consultor Nacional Calidad Cosméticos, Programa

Safe+ de ONUDI Investigación y escritura. [Online]. Available: www.safeplus.com.co

- [64] A. Azeem *et al.*, “Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics,” 2008.
- [65] Y. Zhu *et al.*, “Emulsification of oil-in-water emulsions with eggplant (*Solanum melongena* L.),” *J Colloid Interface Sci*, vol. 563, pp. 17–26, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jcis.2019.12.055.
- [66] E. Kohl, J. Steinbauer, M. Landthaler, and R. M. Szeimies, “Skin ageing,” Aug. 2011. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03963.x.
- [67] M. Sárdy, “Role of matrix metalloproteinases in skin ageing,” 2009. doi: 10.1080/03008200802585622.
- [68] J. Vandooren, N. Geurts, E. Martens, P. E. Van Den Steen, and G. Opdenakker, “Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes,” Mar. 2013. doi: 10.1038/nmeth.2371.
- [69] R. I. Assis Lisboa, M. I. Vinícius Andrade, and J. I. Renan Cunha-Melo III, “Zimography is an effective method for detection of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity in cultured human fibroblasts 1,” 2013.
- [70] L. J. Pérez-García, “Metaloproteinasas y piel,” 2004, *Ediciones Doyma, S.L.* doi: 10.1016/S0001-7310(04)76850-7.
- [71] E. T. Waas, R. M. L. M. Lomme, J. DeGroot, T. Wobbes, and T. Hendriks, “Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer,” *Br J Cancer*, vol. 86, no. 12, pp. 1876–1883, 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600366.
- [72] H. L. Hsieh, H. H. Wang, W. Bin Wu, P. J. Chu, and C. M. Yang, “Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: Roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF- κ B pathways,” *J Neuroinflammation*, vol. 7, Dec. 2010, doi: 10.1186/1742-2094-7-88.

- [73] B. I. Ratnikov *et al.*, “Basis for substrate recognition and distinction by matrix metalloproteinases,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 40, pp. E4148–E4155, Oct. 2014, doi: 10.1073/pnas.1406134111.
- [74] G. S. Chen, M. P. Lu, and M. T. Wu, “Differential expression of matrix metalloproteinase-2 by fibroblasts in co-cultures with keratinocytes, basal cell carcinoma and melanoma,” *Journal of Dermatology*, vol. 33, no. 9, pp. 609–615, Sep. 2006, doi: 10.1111/j.1346-8138.2006.00141.x.
- [75] G. Sriram, P. L. Bigliardi, and M. Bigliardi-Qi, “Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro,” 2015, *Elsevier GmbH*. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.08.001.
- [76] J. Li, J. Chen, and R. Kirsner, “Pathophysiology of acute wound healing,” *Clin Dermatol*, vol. 25, no. 1, pp. 9–18, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007.
- [77] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig, “Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line.”
- [78] B. Lehmann, “HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 108, no. 1, pp. 78–82, 1997, doi: 10.1111/1523-1747.ep12285640.
- [79] M. Feoktistova, P. Geserick, and M. Leverkus, “Crystal violet assay for determining viability of cultured cells,” *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2016, no. 4, pp. 343–346, Apr. 2016, doi: 10.1101/pdb.prot087379.
- [80] C. Veciana Galindo, E. Cortés Castell, L. Torro Montell, E. Sirvent Segura, M. M. Rizo Baeza, and V. Gil Guillén, “Evaluación de la citotoxicidad y bioseguridad de un extracto de polifenoles de huesos de aceitunas,” *Nutr Hosp*, vol. 29, no. 6, pp. 1388–1393, 2014, doi: 10.3305/nh.2014.29.6.7141.

- [81] N. Kar, D. Gupta, and J. Bellare, “Ethanol affects fibroblast behavior differentially at low and high doses: A comprehensive, dose-response evaluation,” *Toxicol Rep*, vol. 8, pp. 1054–1066, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.toxrep.2021.05.007.
- [82] M. V. Berridge, P. M. Herst, and A. S. Tan, “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction,” Sep. 28, 2005. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7.
- [83] J. Varani *et al.*, “Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation,” *American Journal of Pathology*, vol. 168, no. 6, pp. 1861–1868, 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.051302.
- [84] V. M. Schoop, N. Mirancea, and N. E. Fusenig, “Epidermal organization and differentiation of HaCat keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 112, no. 3, pp. 343–353, 1999, doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x.

7. Anexo

7.1. Anexo 1

Tabla 2. Medición de altura de la espuma en centímetros del Test Afrosimétrico.

| Muestra | Tiempo, t (min) | | | |
|---------|-----------------|-----|-----|-----|
| | 0 | 10 | 20 | 30 |
| AG4 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,3 |
| AGE4 | 1,5 | 1 | 1 | 1 |
| AG72 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AGE72 | 2 | 1 | 1 | 0,8 |
| AE72 | 2,9 | 2,8 | 2,7 | 2,7 |
| QG4 | 1,2 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| QGE4 | 1,6 | 1,2 | 1 | 1 |
| QG72 | 1 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |
| QGE72 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| QE72 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| CE72 | 0,9 | 0,7 | 0,5 | 0,5 |

7.2. Anexo 2

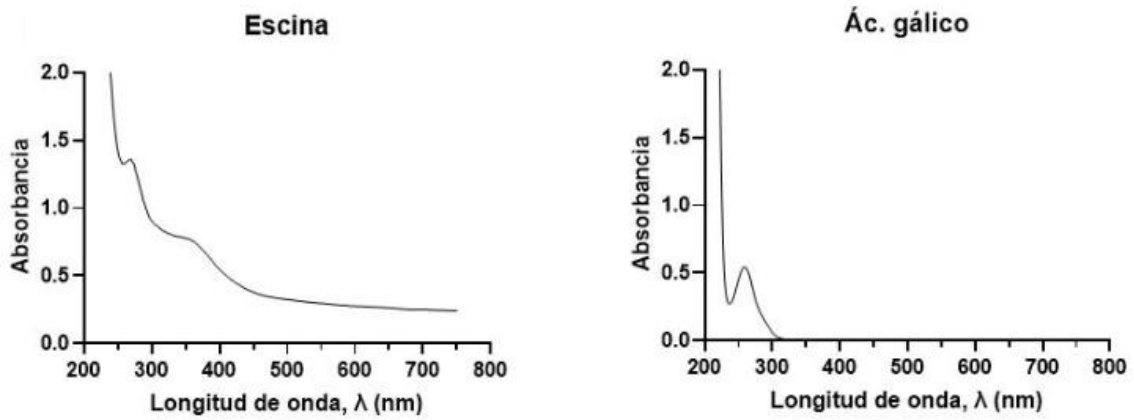


Figura 21. Espectros de absorción UV-VIS entre 200-800 nm para escina y ácido gálico.

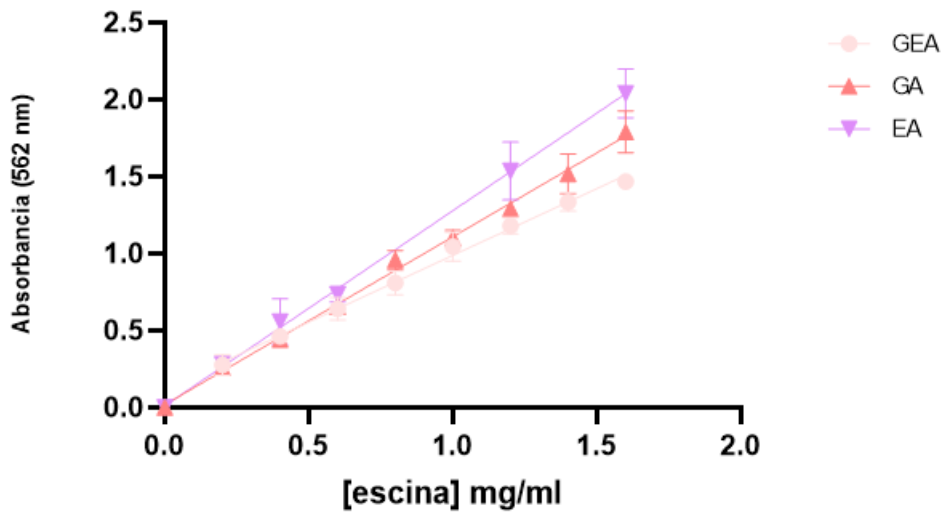


Figura 22. Curva estándar de escina en un rango de 0 a 2 mg/ml para la cuantificación de saponinas. GEA: representa la curva utilizando como matriz 30% glicerina, 20% etanol y 50% agua ($R^2 = 0,9795$), EA: representa la curva utilizando como matriz 50% de etanol y 50% de agua ($R^2 = 0,9827$), GA: representa la curva utilizando como matriz 50% de glicerina y 50% de agua ($R^2 = 0,9855$).

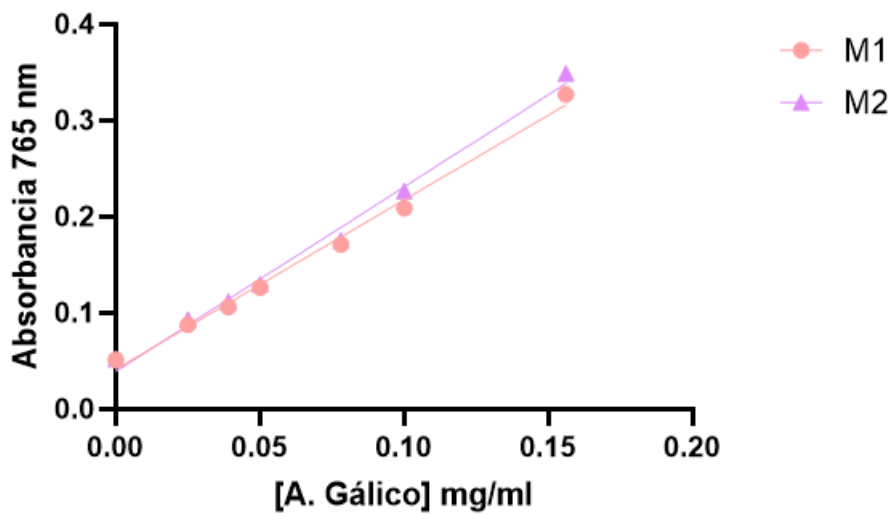


Figura 23. Curva estándar de ácido gálico en un rango de 0 a 0,2 mg/ml para la cuantificación de polifenoles. M1 es la curva realizada con la matriz 50% de agua, 21% glicerina y 29% etanol ($R^2 = 0,9906$), M2 es la curva realizada con la matriz 50% agua, 31% glicerina y 19% etanol ($R^2 = 0,9902$).

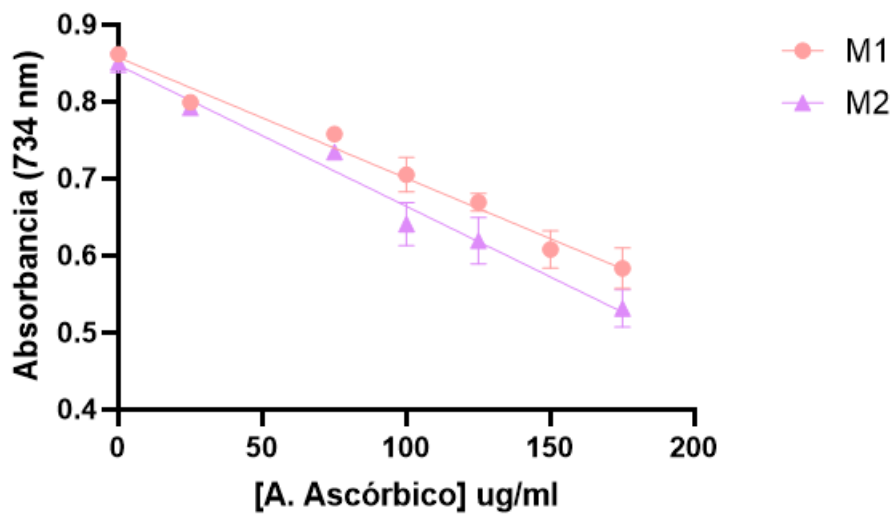


Figura 24. Curva estándar de ácido ascórbico en un rango de 0 a 2000 ug/ml para determinación de la actividad antioxidante. M1 es la curva realizada con la matriz 50% de agua, 21% glicerina y 29% etanol ($R^2 = 0,9629$), M2 es la curva realizada con la matriz 50% agua, 31% glicerina y 19% etanol ($R^2 = 0,9564$).

7.3. Anexo 3

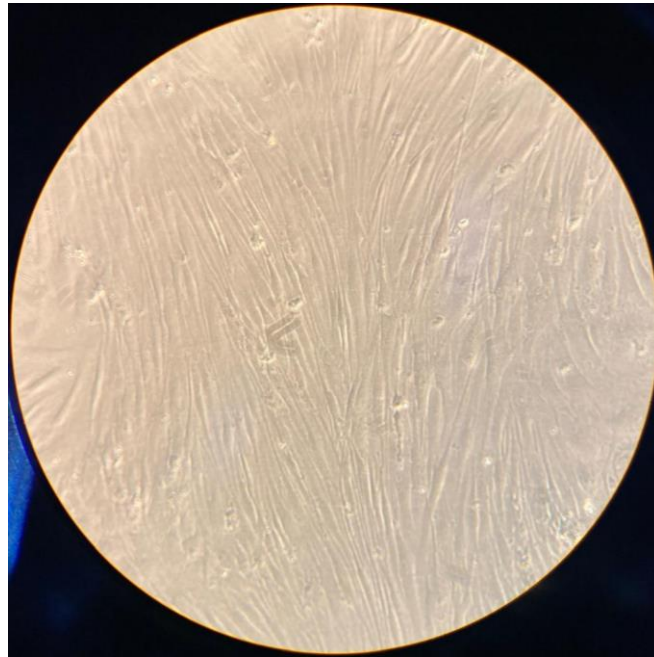


Figura 25. Línea celular HDF1, visualización en microscopio invertido a 100X con un 90% de confluencia.

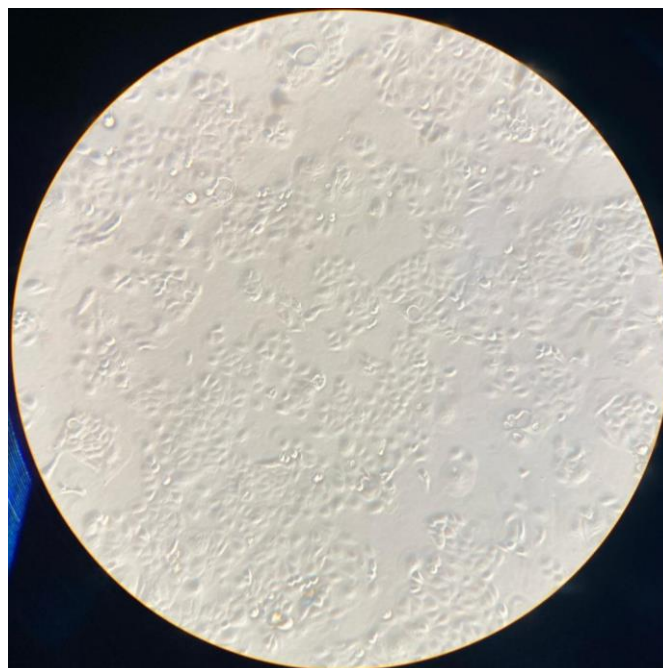


Figura 26. Línea celular HaCat, visualización en microscopio invertido a 100X con un 60% de confluencia.

7.4. Anexo 4



Figura 27. Liofilizado de las muestras M1 y M2

7.5. Anexo 5

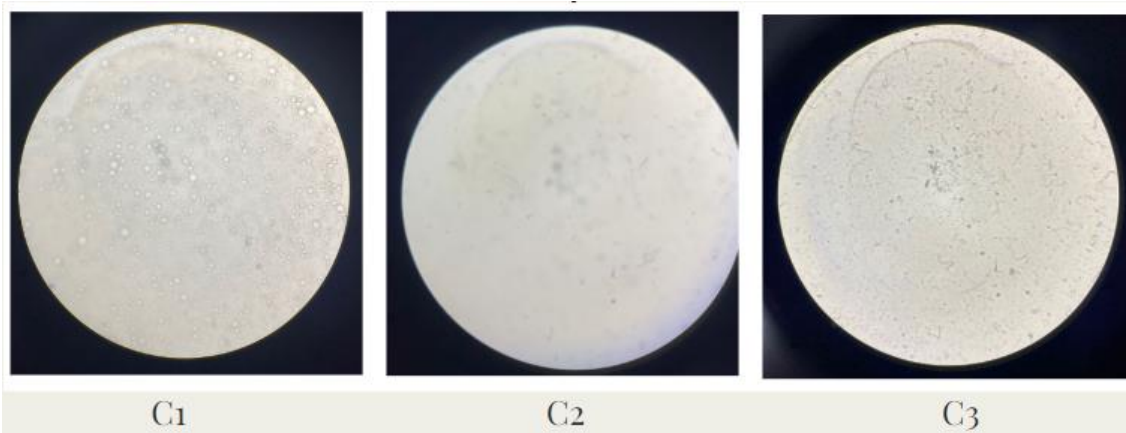


Figura 28. Visualización en microscopio óptico a 40X de las emulsiones realizadas en el ensayo de estabilidad acelerada al instante de generar la mezcla a temperatura ambiente. C1: 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua. C2: 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua. C3: 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.

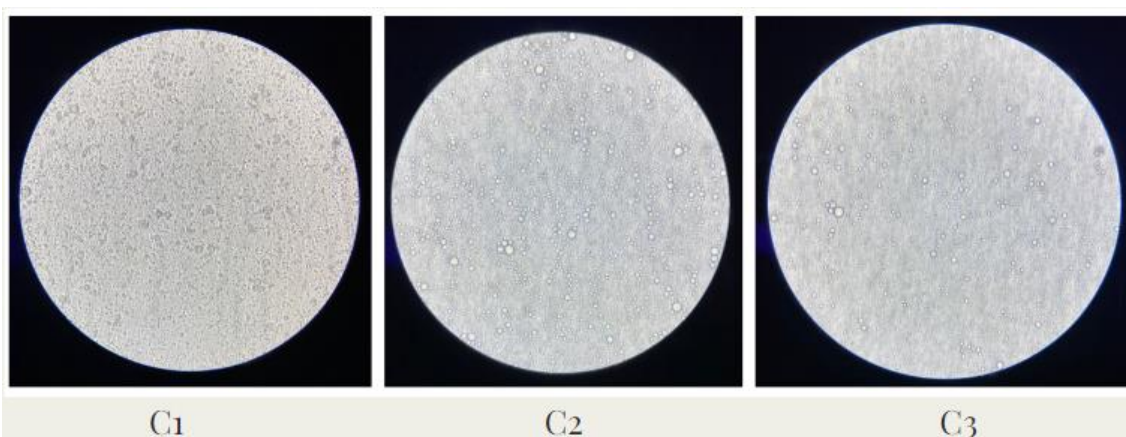


Figura 29. Visualización en microscopio óptico a 40X de las emulsiones realizadas en el ensayo de estabilidad acelerada en la incubación durante 30 minutos a 50 °C. C1: 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua. C2: 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua. C3: 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.

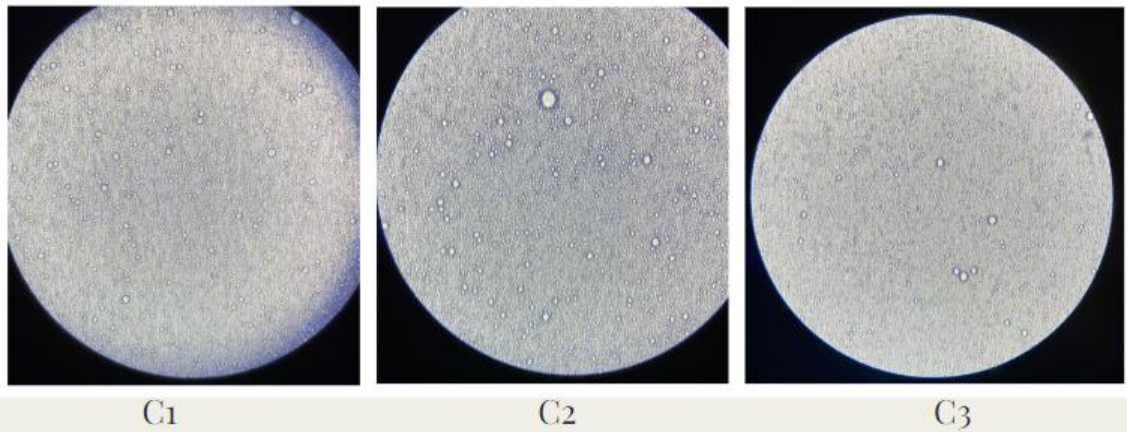


Figura 30 Visualización en microscopio óptico a 40X de las emulsiones realizadas en el ensayo de estabilidad acelerada en la incubación durante 30 minutos a 75 °C. C1: 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua. C2: 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua. C3: 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.

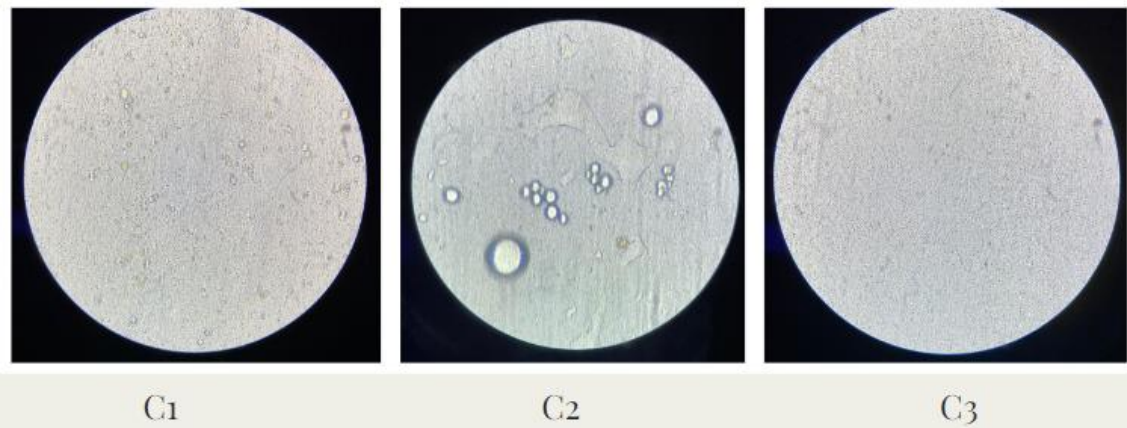


Figura 31 Visualización en microscopio óptico a 40X de las emulsiones realizadas en el ensayo de estabilidad acelerada 30 minutos luego de centrifugado a 3.000 rpm. C1: 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua. C2: 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua. C3: 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.

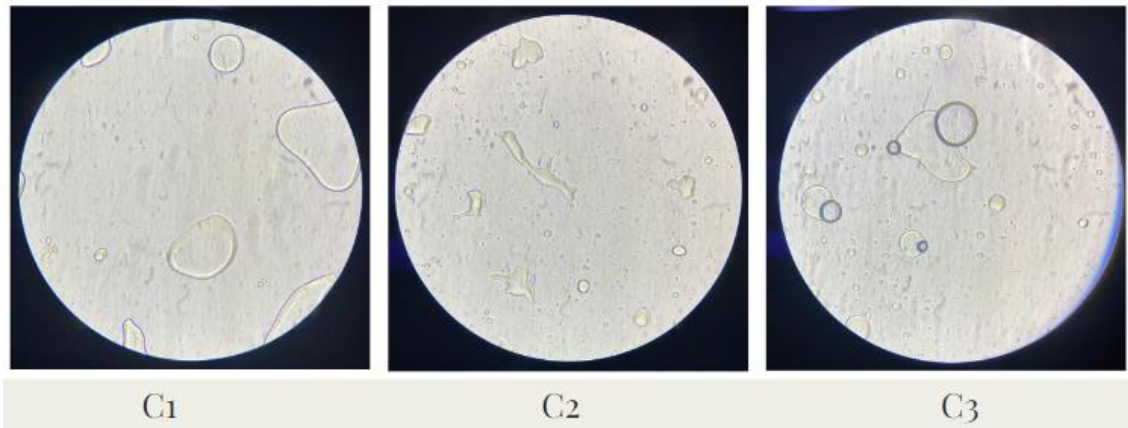


Figura 32. Visualización en microscopio óptico a 40X de las emulsiones realizadas en el ensayo de estabilidad acelerada a las 72 horas luego del ensayo de congelado-descongelado. C1: 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua. C2: 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua. C3: 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.

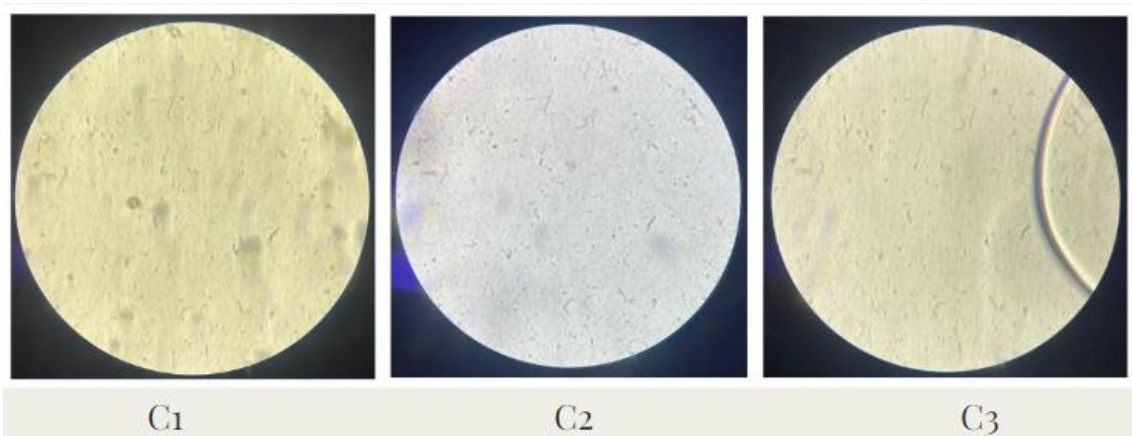


Figura 33. Visualización en microscopio óptico a 40X de las emulsiones realizadas en el ensayo de estabilidad acelerada a los 15 días a temperatura ambiente. C1: 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua. C2: 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua. C3: 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.

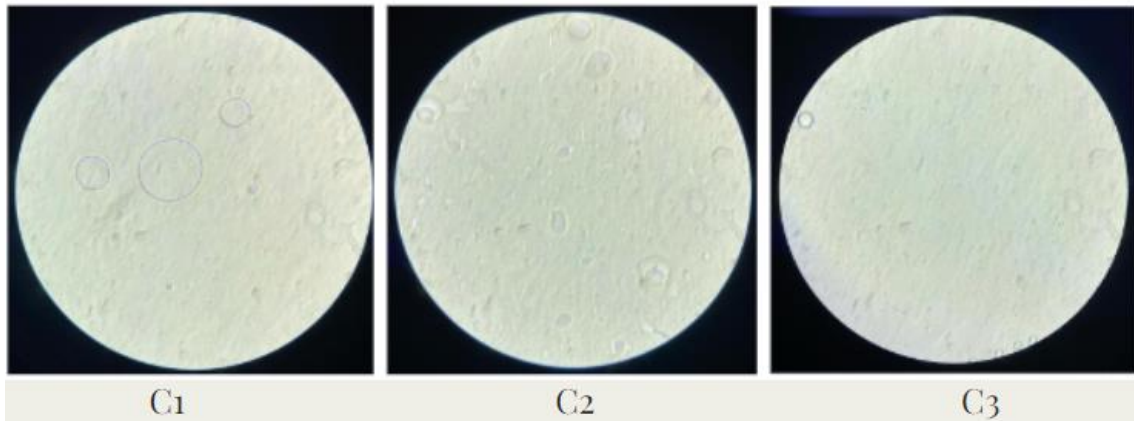


Figura 34 Visualización en microscopio óptico a 40X de las emulsiones realizadas en el ensayo de estabilidad acelerada a los 30 días a temperatura ambiente. C1: 20% de muestra, 10% aceite de oliva, 70% agua. C2: 20% de muestra, 5% aceite, 75% agua. C3: 10% de muestra, 5% aceite, 85% agua.