



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**“Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante,
antielastasa y anticlagenasa en el extracto etanólico
del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V. M.
Badillo y determinación de la actividad fotoprotectora
in vitro en una crema base”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Lourdes Jhuliana CULQUIMBOZ SERVÁN

Jackeline ESCUDERO RODAS

ASESOR

Américo Jorge CASTRO LUNA

Lima, Perú

2018



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante, antielastasa y anticolagenasa en el extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo y determinación de la actividad fotoprotectora *in vitro* en una crema base"

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**JACKELINE ESCUDERO RODAS Y
LOURDES JHULIANA CULQUIMBOZ SERVAN**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

19 Con Mención

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 30 de noviembre de 2018

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Presidente

Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña
Miembro

Q.F. Omar Hugo Santa María Chávez
Miembro

Q.F. Paúl Iván Gutiérrez Elescano
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



DEDICATORIA

Dedico este logro a mis padres, Silvia y Magno, que siempre me apoyaron en mis decisiones y me enseñaron desde pequeña a ser responsable, respetuosa, perseverante e independiente, a mi hermano y toda mi familia de sangre y de corazón, mis amigos de toda la vida, que con sus consejos me ayudan a ser mejor persona.

Jhuliana

DEDICATORIA

Dedico esto a Dios por permitirme estar aquí; a mi familia, por todo el apoyo puesto en mí, gracias mamita por tus palabras de aliento en cada batalla y siempre demostrarme que todo es posible, a ti papito por todo el sacrificio y las ganas de ser mejor cada día; a mis hermanas, mis modelos a seguir; a mi hermano; mi compañero y cómplice, y a todas las personas que a través de sus consejos me motivaron a ser mejor que ayer.

A mi abuelita Carmen por ser un ejemplo de lucha y nobleza, a quien estimo y quiero mucho.

Jackeline

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que estuvieron involucrados en el proceso de elaboración de esta tesis, desde la recolección de los frutos de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo “maushan” hasta el proceso final de elaboración de la crema.

A nuestro asesor, Dr. Américo Castro Luna por su gran apoyo y motivación en la culminación de esta tesis y a los asistentes del grupo, Lourdes y Diego, por su tiempo y apoyo constante.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivo específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. GENERALIDADES	4
2.1. Antecedentes.....	4
2.2. Aspecto botánico	7
2.2.1. Clasificación taxonómica	7
2.2.2. Descripción morfológica.....	7
2.2.3. Descripción geográfica y hábitat	8
2.2.4. Usos y aplicaciones	10
2.3. Polifenoles.....	11
2.3.1. Mecanismo de acción de los polifenoles.....	12
2.4. Antioxidantes y radicales libres	14
2.4.1. Antioxidantes	14
2.4.2. Radicales libres.....	15
2.5. Envejecimiento de la piel	17
2.5.1. La piel	17
2.5.2. Envejecimiento intrínseco y extrínseco	19

2.5.2.1.	Factores relacionados con el envejecimiento intrínseco.....	19
2.5.2.2.	Factores relacionados con el envejecimiento extrínseco.....	20
2.6.	Actividad antienzimática	21
2.6.1.	Enzimas de la piel.....	21
2.6.1.1.	Elastasa	21
2.6.1.2.	Colagenasa	22
2.7.	La radiación ultravioleta (UV)	22
2.7.1.	Mecanismo de acción de la radiación ultravioleta en la piel	23
2.8.	Fotoprotección.....	26
2.8.1.	Fotoprotectores químicos u orgánicos	26
2.8.2.	Fotoprotectores inorgánicos o pantallas minerales.....	27
2.8.3.	Protectores solares naturales	27
2.8.4.	Estudios de estabilidad.....	28
III.	PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1.	Metodología.....	29
3.1.1.	Tipo de estudio	29
3.1.2.	Flujograma del trabajo experimental.....	29
3.2.	Materiales	30
3.2.1.	Materiales de laboratorio	30
3.2.2.	Equipos.....	30
3.2.3.	Reactivos	31

3.3.	Métodos.....	32
3.3.1.	Colecta e identificación del material biológico	32
3.3.2.	Obtención del extracto	32
3.3.3.	Prueba de solubilidad	32
3.3.4.	Marcha fitoquímica.....	32
3.3.5.	Determinación de la contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	33
3.3.6.	Determinación de la actividad antioxidante por el método de 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	34
3.3.7.	Determinación de la actividad antioxidante por el método de β,β' -azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS ^{•+})	36
3.3.8.	Determinación de la actividad anticlagenasa.....	37
3.3.9.	Determinación de la actividad antielastasa.....	38
3.3.10.	Pre-formulación de cremas dermocosméticas	39
3.3.11.	Estabilidad preliminar.....	40
3.3.12.	Determinación in vitro del Factor de Protección Solar (FPS) por el método de Mansur y col.. y Sayre y col... ..	41
3.4.	Análisis estadístico	42
IV.	RESULTADOS	43
V.	DISCUSIÓN	58
VI.	CONCLUSIONES	63
VII.	RECOMENDACIONES	64

VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
IX.	ANEXOS	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de especies de <i>Vasconcellea</i> y su distribución en países de América Latina.....	9
Tabla 2. Objetivos moleculares de importantes polifenoles dietéticos para la prevención del cáncer	14
Tabla 3. Clasificación de antioxidantes.....	15
Tabla 4. Pre-formulación de las cremas dermocosméticas del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo.	37
Tabla 5. Relación entre el efecto eritemogénico (EE) y la intensidad de radiación (I) de cada longitud de onda (λ).	40
Tabla 6. Características organolépticas del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	43
Tabla 7. Rendimiento del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	43
Tabla 8. Prueba de solubilidades del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	43
Tabla 9. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	44
Tabla 10. Contenido de polifenoles del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	45
Tabla 11. Resultados de la actividad antioxidante Trolox por el método DPPH	46
Tabla 12. Resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo por el método DPPH	46
Tabla 13. Resultados de la actividad antioxidante Trolox por el método ABTS ^{•+}	48
Tabla 14. Resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo por el método ABTS ^{•+}	48
Tabla 15. Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del estándar galato de epigallocatequina EGCG.....	50

Tabla 16. Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	51
Tabla 17. Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del estándar galato de epigallocatequina (EGCG).	52
Tabla 18. Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	52
Tabla 19. Características organolépticas de la crema elaborada a base del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo.	54
Tabla 20. pH de las cremas elaboradas a base del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	54
Tabla 21. Prueba de solubilidad de la crema.....	54
Tabla 22. Valores FPS <i>in vitro</i> de las cremas elaboradas a las concentraciones de 1, 3 y 5%	55
Tabla 23. Resultados de la estabilidad preliminar de las cremas al 5%; a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 45 ± 2 y en ciclos de 24 horas (ciclos $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $4 \pm -5^{\circ}\text{C}$).....	56
Tabla 24. Valores FPS <i>in vitro</i> de la crema al 5% luego del proceso de estabilidad preliminar.....	57
Tabla 25. Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método DPPH del extracto etanólico del fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo.	79
Tabla 26. Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método ABTS ^{•+} del extracto etanólico del fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	80
Tabla 27. Análisis estadístico de la actividad anticlagenasa del extracto etanólico del fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo.....	81
Tabla 28. Análisis estadístico de la actividad antielastasa del extracto etanólico del fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo.	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	8
Figura 2. Vista del crecimiento y distribución de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo en su hábitat natural	10
Figura 3. Estructuras químicas de los polifenoles más comunes	12
Figura 4. Sitios de acción de los polifenoles.....	13
Figura 5. Acción de un radical libre ante un átomo normal.....	16
Figura 6. Estructura fundamental de la piel	18
Figura 7. Posibles mecanismos de escisión de la columna vertebral de colágeno	24
Figura 8. Mecanismos que subyacen a los cambios en la red tridimensional de fibras elásticas inducidas por la radiación UV	25
Figura 9. Curva de calibración del estándar de ácido gálico	45
Figura 10. Gráfica de dispersión entre solución patrón de Trolox versus % de inhibición del radical DPPH	47
Figura 11. Gráfica de dispersión entre concentraciones del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo versus % de inhibición del radical DPPH.....	47
Figura 12. Gráfica de dispersión entre solución patrón de Trolox versus % de inhibición del radical ABTS ^{•+}	49
Figura 13. Gráfica de dispersión entre concentraciones del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo versus % de inhibición del radical ABTS ^{•+}	49

Figura 14. Curva de inhibición de colagenasa del estándar galato de epigallocatequina (EGCG)	51
Figura 15. Curva de inhibición de colagenasa del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	51
Figura 16. Curva de inhibición de elastasa del estándar de galato de epigallocatequina (EGCG)	53
Figura 17. Curva de inhibición de elastasa del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	53
Figura 18. Nivel ascendente del FPS en cuanto a las concentraciones 1, 3 y 5% de las cremas en comparación con la crema base	55
Figura 19. Constancia de identificación botánica por el Museo de Historia Natural.....	73
Figura 20. Elaboración del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	75
Figura 21. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	76
Figura 22. Preparación de las pruebas enzimáticas	76
Figura 23. Reactivos a usar en las pruebas enzimáticas.....	77
Figura 24. Crema dermocosmética elaborada a base del fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo al 1%.....	77
Figura 25. Crema dermocosmética elaborada a base del fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo al 3%.....	78
Figura 26. Crema dermocosmética elaborada a base del fruto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo al 5%.....	78

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- DPPH:** radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
- ABTS^{•+}:** ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico
- FPS:** factor de protección solar
- FC:** Folin-Ciocalteu
- ROS:** especies reactivas de oxígeno
- ADN:** Acido desoxirribonucleico
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- ECM:** matriz extracelular
- MMP-1:** metaloproteinasas de la matriz
- HHPE:** alta presión hidrostática
- UE:** ultrasonido
- UAE:** extracción de ultrasonido
- CE:** extracciones convencionales
- RL:** radicales libres
- SOD:** superóxido dismutasa
- AO:** no enzimáticos
- TGFb:** factor de crecimiento transformante-b
- AP-1:** proteína activadora 1
- PABA:** ácido paraaminobenzoico
- ESI-MS-:** electrospray ionization tandem mass spectrometry
- EGCG:** epigallocatequina galato
- IC50:** concentración inhibitoria media máxima
- UV:** radiación ultravioleta (A, B, C)
- HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Presión y polaridad
- FRAP:** Poder antioxidante reductor del hierro.
- O₂⁻:** Superóxido.
- H₂O₂:** peróxido de hidrógeno.
- OH⁻:** hidroxilo
- NO:** óxido nítrico
- EGFR:** factor de crecimiento epidérmico
- MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos
- NF-κB:** factor nuclear kappa B

RESUMEN

El fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo “Maushan” originario del distrito de Granada, provincia de Chachapoyas, región Amazonas es conocido en nuestro país por distintos usos que le dan, desde alimenticio, industrial y medicinal. La presente investigación tuvo como objetivo el estudio *in vitro* de la actividad antioxidante, antielastasa y anticolagenasa de su extracto etanólico, posteriormente la pre-formulación de una crema base con evaluación de la actividad fotoprotectora *in vitro*. Los frutos frescos de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo fueron macerados en etanol de 96° así mismo se hizo uso de un evaporador rotatorio para condensar el producto. El extracto etanólico tuvo como resultado en la cuantificación de polifenoles totales un valor de 7,355 mg GAE/ g extracto. Con respecto a las actividades antioxidantes *in vitro*, para el radical DPPH nos dio un IC50 de 158,303 valor TEAC de 13,6131 mgTrolox/g y para el radical ABTS un IC50 de 98,5051 µg/mL valor TEAC de 25,6961 mgTrolox/g. Con respecto a las actividades antienzimáticas, para la actividad anticolagenasa nos dio un valor de 1,388 mg/mL y para la actividad antielastasa de 4,9278 mg/mL. Después de esto se pre-formuló una crema dermocosmética a tres concentraciones 1, 3 y 5% del extracto, a las cuales se les evaluó la actividad fotoprotectora *in vitro* según el método de Mansur, la que obtuvo mayor eficacia fue la crema al 5% con un FPS de 0,5892, a esta se le realizó un estudio preliminar de estabilidad, basándonos en la prueba de centrifugación y medición del pH. Los resultados muestran que el extracto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo posee un potencial antioxidante, anticolagenasa y antielastasa moderado relacionado con el contenido de polifenoles totales. La crema base elaborada presentó una limitada capacidad fotoprotectora *in vitro*.

Palabras clave: *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, polifenoles, antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, fotoprotectora.

SUMMARY

The fruits of *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo "Maushan" from the district of Granada, province of Chachapoyas, Amazonas region are known in our country for the different uses that they give, from food, industrial and medicinal. The objective of the present investigation was the in vitro study of the antioxidant activity, antielastase and anticollagenase of its ethanolic extract, later the preformulation of a base cream with evaluation of the photoprotective activity in vitro. The fresh fruits of *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo were macerated in 96 ° ethanol, and a rotary evaporator was used to condense the product. The ethanolic extract resulted in the quantification of total polyphenols a value of 7,355 mg GAE / g extract. With respect to antioxidant activities in vitro, for the DPPH radical he gave us an IC50 of 158,303 TEAC value of 13,6131 mgTrolox / g and for the ABTS radical an IC50 of 98.5051 µg / mL TEAC value of 25.6961 mgTrolox / g. With respect to the anti-enzymatic activities, for the anticollagenase activity it gave us a value of 1.388 mg / mL and for the antielastase activity of 4.9278 mg / mL. After this, a dermocosmetic cream was formulated at three different concentrations of 1, 3 and 5% of the extract, to which the photoprotective activity in vitro was evaluated according to the Mansur method, which was the cream with 5% higher efficacy. an SPF of 0,5892, to this a preliminary stability study was made, based on the centrifugation and pH measurement test. The results show that the extract of *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo has an antioxidant, anticollagenase and moderate antielastase potential related to the content of total polyphenols. The elaborated base cream presented a limited in vitro photoprotective capacity.

Keywords: *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, polyphenols, antioxidant, antielastase, anticollagenase, photoprotector.

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Vasconcellea* se están caracterizando por mostrar un potencial interesante y un alcance para la domesticación en diferentes regiones. Los frutos tienen propiedades organolépticas atractivas (por ejemplo: aroma, sabor, color), además de que los cultivos comerciales podrían desarrollarse a partir de la diversidad de sus especies y variedades existentes¹ o en base a nuevas combinaciones de caracteres, hibridando diferentes especies de *Vasconcellea* para su mejoramiento y promoción^{1,2}. Estas especies son comercial y socialmente importantes en su entorno local; sin embargo, podrían suministrar nichos específicos en el mercado internacional. En los hogares de los Andes, sus frutas se consumen frescas, se tuestan, procesan en jugos, se convierten en mermeladas, conservas o se agregan a productos lácteos, hasta las podemos encontrar en salsas, rellenos de tartas y encurtidos³.

Existen pocos antecedentes sobre el estudio antioxidante y fotoprotector de las especies de *Vasconcellea*, dentro del que destaca una investigación en *Vasconcellea pubescens* “papaya chilena” el cual aborda el uso de semillas como fuente de compuestos bioactivos, en donde se encontró una alta correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total, el cual indicó que los compuestos fenólicos podrían ser la principal fuente de actividad antioxidante en esta semilla⁴. En otro estudio relacionado al género *Vasconcellea*; los glucósidos de quercetina; rutina y manghaslin, fueron aislados de los frutos de la papaya de montaña *Vasconcellea pubescens* A. DC. además, se identificaron diecinueve compuestos fenólicos por primera vez en las frutas comestibles por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Los resultados proporcionan información relevante sobre los constituyentes de bajo peso molecular de este importante cultivo de fruta⁵.

En los últimos años, los estudios epidemiológicos y bioquímicos han demostrado que la aparición de diversas enfermedades (por ejemplo; cáncer, enfermedades degenerativas, cardiovasculares y envejecimiento prematuro de la piel) se ha reducido, en particular debido a los efectos antioxidantes de los polifenoles. De hecho, los antioxidantes como los flavonoides y los ácidos fenólicos desempeñan un papel principal en la lucha contra las especies reactivas de oxígeno (EROs), y los

mecanismos inhibidores del fotoenvejecimiento por polifenoles (por ejemplo; inhibición de metaloproteinasas de la matriz (MMP-1), elastasa e hialuronidasa) se están desenmarañando para desarrollar agentes capaces de ralentizar el proceso de envejecimiento^{6,7}.

La piel está constituida básicamente por la matriz extracelular (ECM) la cual se compone de proteoglicanos entretnejidos con macromoléculas; tales como el colágeno, la elastina y la fibronectina, que se producen por los fibroblastos de la dermis. Estas macromoléculas son constantemente atacadas por enzimas tales como metaloproteinasas de matriz (por ejemplo; colagenasa). El proceso extrínseco de envejecimiento de la piel (fotoenvejecimiento) se produce como resultado de ciertos factores, en particular la radiación solar (radiación UV), la cual genera cambios moleculares importantes incluyendo transducción de señales alteradas, disminución de la síntesis de pro-colágeno, daño del tejido conectivo y aumentó significativamente de las especies reactivas de oxígeno (ROS), actuando estas como moléculas de señalización celular que pueden causar peroxidación de lípidos, daño mitocondrial y del ADN⁶.

Los extractos naturales han sido una de las principales estrategias utilizadas para desacelerar y prevenir los efectos del envejecimiento cutáneo, muchas plantas han sido reportadas por contener metabolitos bioactivos principalmente componentes polifenólicos con efecto fotoprotector y antioxidante, Recientemente, se ha informado que *Emblica officinalis* es un agente antiaging al promover la producción de procolágeno e inhibir metaloproteinasas de la matriz (MMP-1) en fibroblastos de piel de humanos y ratones⁸. Por lo tanto, existen numerosas oportunidades importantes de investigación y desarrollo para descubrir productos novedosos y efectivos para el cuidado de la piel.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de polifenoles, evaluar la actividad antioxidante y antienzimática del extracto del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, así como comprobar la acción antioxidante y fotoprotectora de las cremas dermocosméticas, con el fin de desarrollar productos con valor agregado a partir de fuentes naturales oriundos del Perú.

1.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante, antielastasa, anticlagenasa del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo y determinar la actividad fotoprotectora *in vitro* en una crema base.

1.2. Objetivos específicos

- 1) Cuantificar el contenido de polifenoles totales, por el método de Folin-Ciocalteu, en el extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.
- 2) Determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, mediante los métodos de captación del radical 2,2 difenil-1-picrililhidrazil (DPPH) y del radical ácido 2,2-azinobis (3-etilbezotiazolin)-6-sulfónico (ABTS).
- 3) Determinar la actividad antielastasa y anticlagenasa del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.
- 4) Determinar el efecto fotoprotector *in vitro* a las concentraciones de 1, 3 y 5% del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo mediante el método del FPS Mansur.

1.3. Hipótesis

El extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo posee actividad antioxidante, antielastasa, anticlagenasa y su crema base actividad fotoprotectora.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

La familia Caricaceae comprende seis géneros y 36 especies distribuidas desde el nivel del mar hasta los 3500 msnm. El género *Vasconcellea* es el segundo en importancia de las Caricaceae, por tener especies frutales conocidas comúnmente como papayas de montaña o papayuelas distribuidas a lo largo de los Andes y el piedemonte andino^{9, 10}.

Investigaciones acerca del género *Vasconcellea* muestran el uso del látex según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) como ablandador de carnes mientras que el Consejo nacional de investigación de Colombia aborda a las demás especies como fuentes de la enzima papaína. Investigaciones preliminares del análisis de papaína en algunas especies de *Vasconcellea* por ejemplo en Ecuador, revelan una alta actividad proteolítica cuando las comparamos con *Carica papaya*, una especie ya conocida y muy estudiada. Es poco conocido el uso medicinal de estas especies; la fruta ha sido usada en la esclerosis arterial y el látex para curar la micosis de la piel y la verruga plana¹¹.

En el Perú, una investigación realizada con el fin de incentivar la producción y nuevas fuentes de trabajo, fue la caracterización de la pulpa de frutos de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo para la elaboración de mermeladas siendo la mermelada con mayor aceptación por los panelistas aquella en la que se empleó un fruto en estado maduro y una concentración azúcar/pulpa de 50/50. En la evaluación de la estabilidad fisicoquímica se observó ligeras fluctuaciones de los grados brix, pH y acidez en los dos meses de almacenamiento; el recuento de mohos, levaduras y aerobios mesófilos viables fueron inferiores a 10 ufc/ g¹².

En la investigación realizada en nuestro país acerca de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, se evaluó la extracción de la pectina, hidrocoloide que en solución acuosa presenta propiedades espesantes, estabilizantes y gelificante por hidrólisis ácida de sus frutos en dos índices de

madurez; para lo cual se recolectó frutos con índice de madurez en 3,64 y 6,51 respectivamente. Se realizó la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico, ácido fosfórico y ácido cítrico, siendo los niveles de pH del agua acidulada 2,0; 2,5 y 3,0, para la extracción de pectina; en donde los mayores rendimientos de pectina con menores tiempos de gelificación se registraron en frutos de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo en estado de madurez y empleando ácido fosfórico y ácido cítrico en el agua acidulada¹².

Otra investigación en especies relacionadas a *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, fue el caso de *Vasconcellea pubescens* “papaya chilena” la cual abordó el uso de semillas como fuente de compuestos bioactivos mediante el uso de diferentes tipos de extracciones asistidas, como la alta presión hidrostática (HHPE), ultrasonido (EU) y extracción con agitación (EA), en donde se encontró una alta correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico total indicando que los compuestos fenólicos podrían ser la principal fuente de actividad antioxidante en esta semilla. Los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados; el ácido oleico (ω -9) y linoleico (ω -6) fueron los principales ácidos en las semillas de papaya. Por lo tanto, el HHPE y el EU son considerados como métodos efectivos para la extracción de biocompuestos de semillas de papaya chilenas y podrían tener beneficios potenciales para las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica⁴.

En otra investigación, esta vez con los frutos de *Vasconcellea pubescens*, se evaluó y comparó los diferentes métodos de extracción mediante el uso de HHPE, EU y sus combinaciones para la extracción de compuestos bioactivos de papaya chilena; en donde la capacidad antioxidante del extracto fue evaluada por tres métodos; ensayo de eliminación de radicales DPPH, potencial antioxidante reductor férrico (FRAP) y voltamperometría. Los compuestos fenólicos y la vitamina C mediante HPLC. El valor más alto encontrado para fenoles totales fue de 129,1mg GAE/ 100g, la capacidad antioxidante por DPPH fue de 20,6mM TE/ 100 g, y voltamperometría 141,0mM TE / 100g para el método HHPE-UE en la extracción de compuestos libres. En cuanto al contenido de vitamina C fue de 74mg/ 100g por HHPE-UE (un método de extracción combinada). Los compuestos fenólicos rutina y ácido p-cumárico se encontraron en todos los extractos, tanto en formas libres como enlazadas,

respectivamente; concluyendo que *Vasconcellea pubescens* es rico en compuestos bioactivos como compuestos fenólicos y vitamina C que contribuyen a la capacidad antioxidante. Además, puede inferirse que HHPE-UE es el método de extracción combinada más eficiente para compuestos bioactivos contenidos en frutos de papaya¹³.

En la identificación de los glicósidos de quercetina rutina y manghaslin de los frutos de la papaya de montaña *Vasconcellea pubescens* A. DC. cultivados en Chile, se hizo uso del fraccionamiento selectivo, usando el blanqueo del eliminador de radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) como ensayo guía. Además, están identificados diecinueve compuestos fenólicos de las frutas comestibles realizados por HPLC con detección ultravioleta (UV) y espectrometría de masas en conjunto con ionización por electropulverización (ESI-MS-MS). Diez de los compuestos detectados en los frutos y las fracciones activas se caracterizaron tentativamente como glicósidos de ácido hidroxicinámico y nueve como derivados de glicósidos de la quercetina. Los resultados proporcionan información relevante sobre los constituyentes de bajo peso molecular de este importante cultivo de fruta⁵.

Con base en estudios de laboratorio y epidemiológicos, se sugiere que los agentes naturales podrían tener un enfoque eficaz para reducir el daño solar inducido por UV y otros trastornos de la piel, al ser usados como fuentes dietéticas y/o suplementos del cuidado de la piel o protectores solares.⁶ En un futuro próximo, las autoridades reguladoras deberán enmarcar leyes relacionadas con la seguridad, la eficacia y la evaluación de la calidad de los nuevos cosmeceúticos¹⁴.

2.2. Aspecto botánico

2.2.1. Clasificación taxonómica

La identificación y clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo 1). Su posición taxonómica se determinó según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Dilleniade

ORDEN: Violales

FAMILIA: Caricaceae

GÉNERO: *Vasconcellea*

ESPECIE: *Vasconcellea weberbaueri* (Harms)

V.M.Badillo

Sinónimo nomenclatural: *Carica weberbaueri* .Harms

2.2.2. Descripción morfológica

Arbusto o árbol de unos 4-5 m de alto, látex blanco de flores verde amarillentas, reunidas en racimos siendo las bayas amarillentas a la madurez¹⁵ (Figura 1). Las hojas son alternas, a menudo dispuestas en espiral en las puntas de las ramas. Las estípulas están ausentes o, cuando están presentes, como espinas. Las flores se pueden encontrar solitarias o en cimas y rara vez son bisexuales. Las especies son en su mayoría dioicas. La flor regular consiste en cinco sépalos y cinco pétalos con diez anteras en la flor masculina más pequeña y un ovario superior en la flor femenina más grande. El estilo es corto y está coronado por cinco estigmas. Las semillas muestran una capa gelatinosa, la sarcotesta, un embrión recto y un endosperma proteináceo oleoso.

La fruta es una baya, el tallo de las especies de *Vasconcellea* y *Carica* es muy inusual ya que hay poco desarrollo del xilema secundario. La madera está formada en gran parte por el floema, que le da rigidez al tronco¹⁶.



Figura 1. Fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo
(fuente propia)

2.2.3. Descripción geográfica y hábitat

Familia con 6 géneros y unas 34 especies de regiones tropicales y calurosas de América y de África tropical. En el Perú, habitan 3 géneros y unas 14 especies, de estas 4 son endémicas, es una especie endémica del Perú. Recolectada solamente en los departamentos de Amazonas, Cajamarca y La Libertad¹⁵. Crece en los valles interandinos, en laderas, entre los 1 500- 3 013 metros de elevación^{15,17}. Esta fruta es ahora el cuarto cultivo de frutas tropicales más importante, abarcando 370,000 hectáreas y alcanzando una producción mundial anual en 2007 de casi 7 megatoneladas (Mt). Su importancia social es aún mayor, ya que está mejor adaptada que otros cultivos de frutas grandes a parcelas pequeñas y no muestra una estacionalidad marcada en la producción, proporcionando una fuente regular de alimentos, vitaminas, trabajo e ingresos a lo largo del año. (Figura 2)¹⁸. Los estudios claramente confirmaron la asociación del género con los Andes y el centro de su diversidad como el sur de Ecuador que posee 16 de las 21 especies, otros países con alta diversidad de especies son Colombia y Perú. El

análisis de los datos climáticos en los sitios de recolección muestra que la mayoría de las especies de *Vasconcellea* se adaptan a las zonas con temperaturas templadas (por lo tanto, su preferencia por altitudes más altas) con una precipitación anual promedio que oscila entre 800 y 1400 mm. (Tabla 1)^{17,18}.

Tabla 1. Lista de especies de *Vasconcellea* y su distribución en países de América Latina¹⁷.

Especies	País	Sitios de cultivo
<i>V. candicans</i>	Ecuador, Perú	Bosque, huertos
<i>V. cualiflora</i>	Colombia, Costa Rica, Venezuela, Nicaragua, Panamá, Guatemala, México, Honduras, El Salvador	Bosque, huertos
<i>V. chilensis</i>	Chile	Bosque
<i>V. crassipetala</i>	Colombia, Ecuador	Bosque
<i>V. cundinamarcensis</i>	Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú, Bolivia, Panamá, Chile, Costa Rica	Bosque, huerto
<i>V. glandulosa</i>	Bolivia, Argentina, Perú, Brasil	Bosque
<i>V. goudotiana</i>	Colombia, Ecuador (reciente introducción), Venezuela	Bosque, huerto
<i>V. horovitziana</i>	Ecuador	Huerto
<i>V. longiflora</i>	Ecuador, Colombia	Huerto
<i>V. microcarpa</i>	Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela, Brasil, Bolivia, Costa Rica, Panamá	Huerto
<i>V. monoica</i>	Ecuador, Bolivia, Perú, Colombia	Bosque, huerto
<i>V. omnilingua</i>	Ecuador	Bosque
<i>V. palandesis</i>	Ecuador	Bosque
<i>V. parviflora</i>	Ecuador, Perú	Bosque, ocasionalmente usado como ornamental
<i>V. pulchra</i>	Ecuador, Colombia	Bosque
<i>V. quercifolia</i>	Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú	Bosque, huerto, cercos
<i>V. sphaerocarpa</i>	Colombia	Bosque
<i>V. sprucei</i>	Ecuador	Bosque
<i>V. stipulata</i>	Ecuador	Bosque, huerto
<i>V. weberbaueri</i>	Ecuador, Perú	Bosque
<i>V. xheilbornii</i>	Ecuador, Perú	Cultivo, comercial, huertos



Figura 2. Vista del crecimiento y distribución de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V. M. Badillo en su hábitat natural¹⁸.

2.2.4. Usos y aplicaciones

Poco se sabe sobre los valores medicinales de *Vasconcellea*, aunque la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) menciona el uso de la fruta para tratar la esclerosis arterial y el uso del látex para curar la micosis cutánea y el plano de la verruga. Los nombres vernaculares de varias especies del género *Vasconcellea* se refieren a las propiedades antidiarreicas de sus semillas. Recientemente, se demostró la aplicación médica de proteinasas de *Vasconcellea cundinamarcensis* en modelos de roedores experimentales en los que se demostró que curaban las úlceras gástricas inducidas químicamente¹⁵. La importancia económica de la familia no solo se encuentra en la papaya, sino también en la producción de papaína, una cisteína proteasa ampliamente utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica¹⁹.

2.3. Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de fitoquímicos, principalmente metabolitos secundarios presentes en las plantas, verduras y frutas, que pueden proporcionar color, sabor, astringencia, aroma, estabilidad oxidativa, y protección en entornos poco habituales²⁰. Químicamente, los compuestos fenólicos se pueden definir como sustancias que llevan al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo²¹.

Estos constituyentes son muy diversos y pueden clasificarse estructuralmente en diferentes grupos como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Figura 3). Los flavonoides se pueden dividir en seis subclases: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavononoles. Dependiendo de sus sustituyentes y de la insaturación más abundante que presentan, pueden dividirse en varios grupos, siendo los flavonoles y los flavanoles los más abundantes en los alimentos, como las bayas y los cítricos. Los ácidos fenólicos se clasifican en ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico. El contenido de ácido hidroxibenzoico en plantas comestibles es generalmente muy bajo a excepción de ciertos frutos rojos, rábanos negros y cebollas. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes; sin embargo, raramente se encuentran en forma libre, excepto en alimentos procesados que se han congelado, esterilizado o fermentado. El ácido hidroxicinámico se encuentra en todas las partes de la fruta, aunque las concentraciones más altas están presentes en las partes externas de las frutas maduras^{22, 23}.

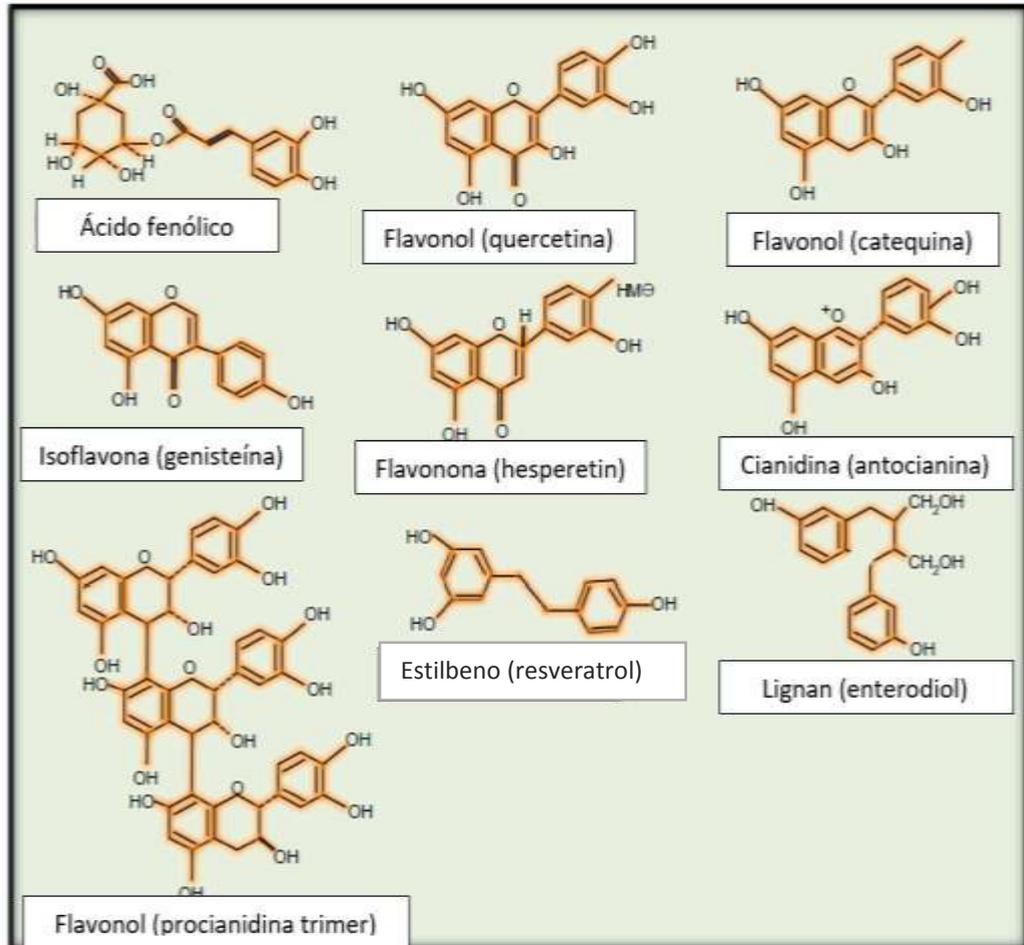


Figura 3. Estructuras químicas de los polifenoles más comunes²³.

2.3.1. Mecanismo de acción de los polifenoles

La piel tiene su propio mecanismo de defensa antioxidante que lo protege de los efectos nocivos de diversos contaminantes ambientales y carcinógenos, incluida la radiación UV, esta genera moléculas de oxígeno conocidas como "radicales libres". Sin embargo, en el caso de exposición extensa o crónica a lo anterior, la actividad antioxidante puede volverse más débil o ineficiente, llevando a la inmunosupresión, envejecimiento prematuro y desarrollo de cáncer de piel. Originando así una peroxidación lipídica epidérmica y una infiltración excesiva de leucocitos en la piel, lo que conduce a la sobreproducción de óxido nítrico (NO), peróxido de

hidrógeno (H₂O₂) y especies reactivas de oxígeno (EROs), que crea un estado de estrés oxidativo.

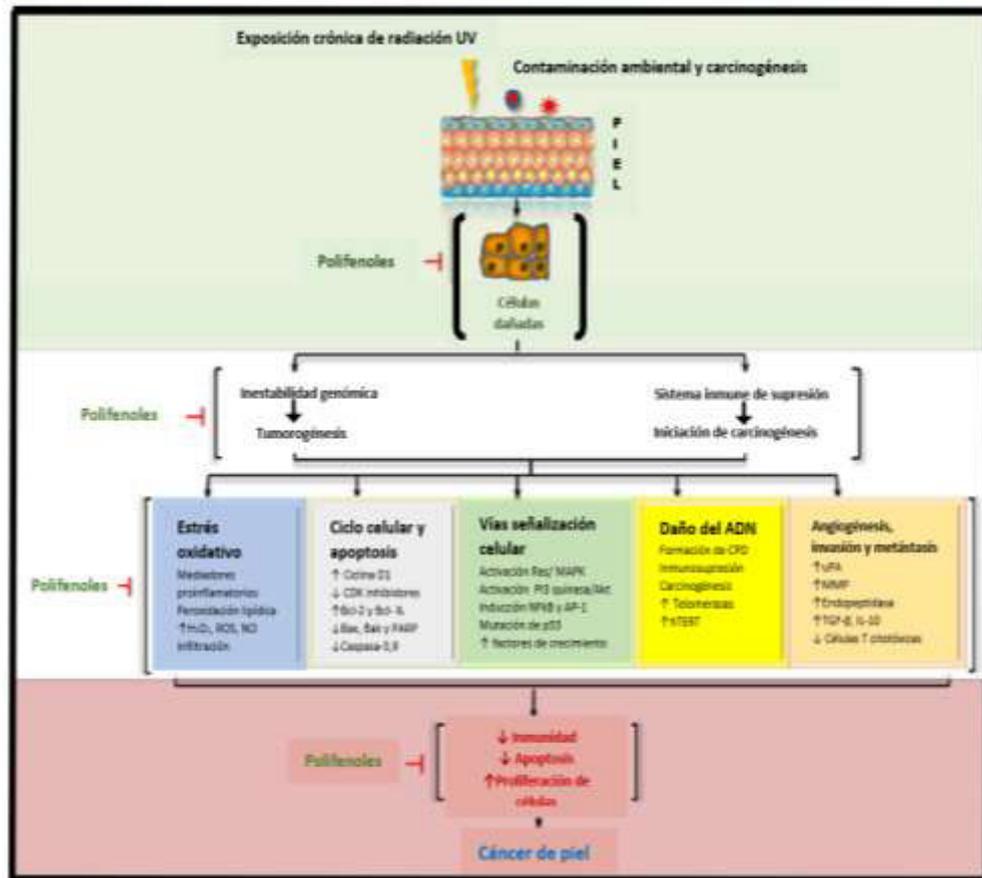


Figura 4. Sitios de acción de los polifenoles²⁴.

Los polifenoles protegen a los componentes celulares contra el daño oxidativo a través de la eliminación de estos radicales libres. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su interacción con iones metálicos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los iones metálicos son la causa principal de la generación de EROS y desempeñan un papel importante en la generación de estrés oxidativo, daños en el ADN y muerte celular²⁴. Las células responden a los polifenoles principalmente a través de interacción directa con receptores o enzimas involucradas en la transducción de señales, lo que puede modificar el estado redox de la célula y desencadenar una serie de reacciones dependientes de redox²⁵.

26.

Otro efecto del estrés oxidativo es el daño a las proteínas. Los grupos de carbonilo tóxico en las proteínas derivadas después de la oxidación de ciertos aminoácidos como la lisina, la arginina y la prolina se producen en exceso durante la exposición crónica a la radiación UV provocando daños en la piel. Se ha demostrado que se inhibe la reducción inducida por la radiación UV de enzimas de defensa antioxidante como catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y el glutatión²⁷. Además, se ha demostrado que el galato de epigallocatequina (EGCG) inhibe la liberación intracelular de H₂O₂ inducida por la radiación, la fosforilación mediada por estrés oxidativo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y las vías de señalización del factor nuclear kappa B (NF-κB) (Tabla 2)²⁸.

Tabla 2. Objetivos moleculares de importantes polifenoles dietéticos para la prevención del cáncer²⁸.

Polifenoles	Dianas moleculares
Ácido fenólico Ácido cafeico Curcumina Ácido ferúlico	Inibidores ROS, H ₂ O ₂ , iNOS Inhibición de NF-κB, AP-1, ERK y proteínas MAPK
Flavonoides Catequinas EGCG Pro-antiocianidinas Silimarina	H ₂ O ₂ , PG, ciclooxigenasa, iNOS Potenciar las enzimas de defensa antioxidante Factores de transcripción de proteínas NF-κB, AP-1, MAPK Detención del ciclo celular y proapoptótica Inhibición del daño del ADN Mecanismo de reparación del ADN Anti-angiogénica y prevención de metástasis
Lignanós Enterolignanós	Antioxidantes
Estilbenos Resveratrol	H ₂ O ₂ , PG, ciclooxigenasas Tumor supresor p53 Regulador del ciclo celular por ejemplo ciclinas, CDKs Factores de transcripción NF-κB, AP-1, c-Jun y c-fos VEGF Matriz de metaloproteínasa TRAOL, Akt, Bcl-2 y Bcl-X _L

2.4. Antioxidantes y radicales libres

2.4.1. Antioxidantes

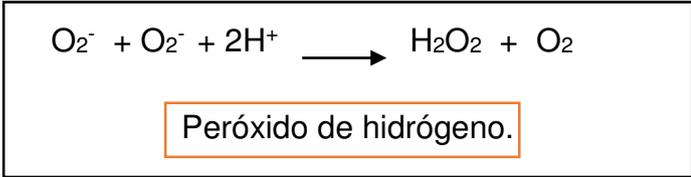
Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen radicales libres (RL). Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posean una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL²⁹.

Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no. Estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta) (Tabla 3)²⁹.

Tabla 3. Clasificación de antioxidantes²⁹.

Exógenos	Endógenos No enzimáticos
Vitamina E (VE)	Glutación. Coenzima Q
Vitamina C (VC)	Ácido tiótico
Betacaroteno (BC)	Enzimáticos. Cofactor
Flavonoides	Superóxidodismutasa (SOD), cobre, manganeso, zinc. Catalasa (CAT), hierro
Licopeno	Glutaciónperoxidasa (GPX) Selenio

Como antioxidante endógeno, está la enzima superóxido dismutasa (SOD), cuya única función es destruir el radical superóxido (O_2^-), un tipo de radical que se forma cuando el oxígeno molecular capta un electrón adicional. La SOD cataliza la reacción siguiente:



El peróxido de hidrógeno también es un agente oxidante potencialmente reactivo, razón por la cual se usa a menudo como desinfectante y blanqueador³¹.

2.4.2. Radicales libres

Se considera radical libre o especie reactiva de oxígeno (EROS) aquella molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad,²⁹ solo persisten durante un tiempo muy breve antes de colisionar con otra molécula y sustraer o donar un electrón para alcanzar estabilidad. Al hacerlo generan un nuevo radical a partir de la molécula con la cual colisionaron. El único modo en el cual se puede desactivar un radical libre, y así poner fin a esta reacción en cadena, es si dos radicales reaccionan juntos, cuando los electrones no apareados pueden formar parte en una u otra moléculas originales (Figura 5)³⁰.

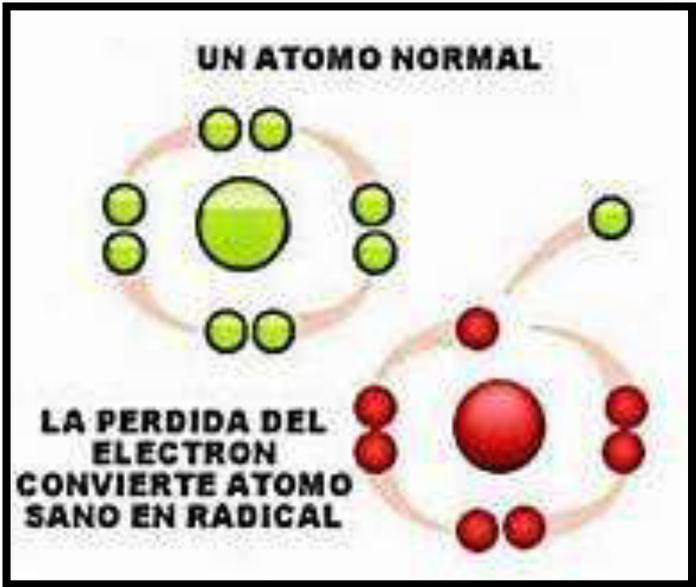


Figura 5. Acción de un radical libre ante un átomo normal³⁰.

Los radicales libres son muy reactivos y capaces de producir alteraciones químicas a muchos tipos de moléculas, incluidos proteínas, ácidos nucleicos y lípidos³¹. Los radicales libres también pueden originarse a partir de contaminantes ambientales y del consumo de ciertos alimentos, lo cual incrementa su concentración en la célula, ocasionando un fenómeno conocido como estrés oxidativo, el cual está asociado con diversas enfermedades crónico degenerativas³².

La protección contra daño por radicales es proporcionada por enzimas que eliminan iones superóxido y peróxido de hidrógeno, reacción de radicales con compuestos como vitaminas C y E, caroteno, ubiquinona, ácido úrico, y polifenoles de la dieta que forman radicales relativamente estables que persisten suficiente tiempo como para pasar por una reacción hacia productos no radicales³⁰.

2.5. Envejecimiento de la piel

2.5.1. La piel

La piel es el órgano más grande en los humanos, su área alcanza 1,6 – 1,8 m² en adultos. La estructura fundamental de la piel se compone de tres capas de afuera hacia adentro, la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo (Figura 6). La epidermis tiene un grosor de 0,1 – 0,2 mm y está llena de células que incluyen a los queratinocitos epidérmicos.

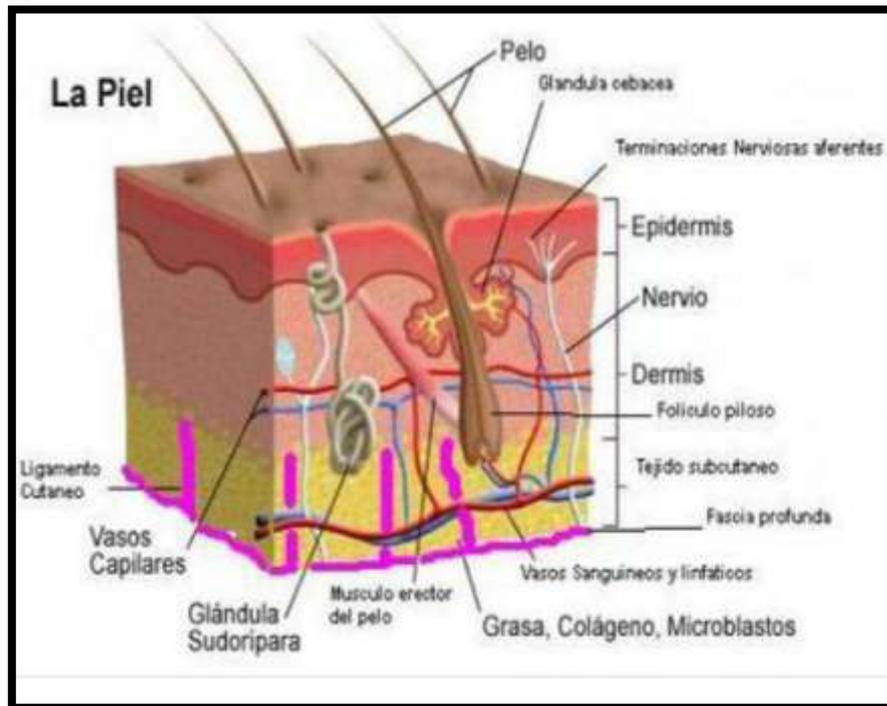


Figura 6. Estructura fundamental de la piel³¹.

La dermis tiene un grosor de 1-2 mm y contiene menos células que la epidermis, su matriz extracelular compuesta principalmente de fibras de colágeno, fibras elásticas y sustancia fundamental (matriz extrafibrilar), son sintetizadas por fibroblastos dérmicos. Los principales componentes son el colágeno, que consiste principalmente en colágenos tipo I y tipo III. Los colágenos consisten en proteínas fibrosas que forman una estructura de triple hélice con tres moléculas de colágeno reticuladas intermolecularmente, lo que lleva a una arquitectura jerárquica de las matrices de colágeno. Otro componente importante de la dermis es la elastina, que consiste en una fibra elástica, que exhibe propiedades elásticas no muy diferentes a las de un resorte. Las fibras elásticas, junto con las fibras de colágeno, construyen una arquitectura de red en la dermis y proporcionan propiedades físicas para la recuperación tras la deformación de la piel. Los espacios intermedios entre estas estructuras de proteínas están ocupados por diversos mucopolisacáridos, como el ácido hialurónico, el sulfato de condroitina y el sulfato de heparán, que pueden retener abundante agua. La red de circulación sanguínea opera

en la dermis, proporcionando oxígeno y componentes nutricionales a la piel.

El tejido subcutáneo almacena grasas, su grosor varía entre sitios anatómicos e individuos. Los órganos adicionales, conocidos colectivamente como apéndices, incluyen folículos pilosos, glándulas sebáceas y conductos sudoríparos. Las glándulas sudoríparas son órganos independientes y el sudor sintetizado se secreta a la superficie de la piel a través de los conductos sudoríparos. Las uñas, que se originan en la epidermis, también se consideran apéndices³¹.

2.5.2. Envejecimiento intrínseco y extrínseco

El envejecimiento intrínseco, también llamado envejecimiento verdadero o cronológico, ocurre como una consecuencia natural de los cambios fisiológicos a lo largo del tiempo. En este caso, la genética individual es responsable principal, entre otros factores que también están presentes, pero tienen menos efecto³².

2.5.2.1. Factores relacionados con el envejecimiento intrínseco

La etnicidad: se relaciona con la diferencia en la pigmentación. Los altos niveles de pigmentación de la melanina protegen de los efectos acumulativos del fotoenvejecimiento. La piel negra es más compacta y tiene una mayor cantidad de lípidos³³, se observó además que los sujetos asiáticos desarrollaron arrugas más tarde y en menor grado de intensidad en comparación con los caucásicos³⁴.

Variaciones anatómicas: algunas áreas de la piel son más delgadas que otras y en esas regiones más delgadas de la piel, el envejecimiento se vuelve más evidente. Esto se observa especialmente en los párpados, área más delgada de la piel en el cuerpo humano. También hay variabilidad tanto en la composición como en la distribución de lípidos en la piel³⁵.

Cambios hormonales: los estrógenos influyen en la síntesis de colágeno por los fibroblastos, conducen a la síntesis aumentada de ácido hialurónico, promueven la retención de agua y aumentan la matriz extracelular. Condiciones de hipoposterogenismo, como suele ocurrir en la menopausia, puede tener un efecto profundo en la piel, porque se vuelve más delgado y menos hidratado³⁶.

2.5.2.2. Factores relacionados con el envejecimiento extrínseco

El envejecimiento extrínseco se debe a factores controlables y ocurre en diferentes grados de intensidad, debido a la exposición solar, el tabaquismo y la gravedad, así como otros factores generales del estilo de vida, como la dieta, el sueño y la salud general³².

Condiciones ambientales: las altas temperaturas conducen a un aumento en la evaporación del agua, mientras que las bajas temperaturas proporcionan endurecimiento y pérdida de agua reducida a través del mismo mecanismo, incluso con abundante humedad del aire. La apropiada formación de proteínas estructurales y lípidos en la piel depende también de la temperatura ambiental³⁷.

Exposición a la luz del sol: la foto-exposición induce una avalancha de cambios moleculares y celulares que desencadenan un trastorno rápido y dinámico en la piel, a diferencia de los cambios intrínsecos que ocurren lentamente. Estas dos formas de envejecimiento son responsables de diferentes cambios en la piel, actuando también de una manera sinérgica³⁸.

2.6. Actividad antienzimática

2.6.1. Enzimas de la piel

La actividad de las enzimas, en general, depende de la concentración de las mismas, de los sustratos, de la disponibilidad de cofactores, de otras enzimas (coenzimas) y dos aspectos fundamentales que son la temperatura y el pH. Cada enzima tiene una temperatura óptima de acción, fuera de este rango la enzima enlentece su velocidad de reacción. De igual manera, la actividad enzimática también está regulada por el pH de cada solución, donde el pH óptimo o intervalo de pH de cada enzima es diferente y, cuando varía, la conformación de la enzima se altera, produciéndose un cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo, que ya no es funcional³⁹.

El colágeno y la elastina son proteínas estructurales de la matriz extracelular. El deterioro o remodelación de las fibras de colágeno y elastina facilita la angiogénesis y la metástasis, el daño del colágeno y las proteínas de elastina sirven como sensibilizadores adicionales al estrés foto oxidativo⁴⁰.

2.6.1.1. Elastasa

Las fibras de elastina que proporcionan propiedades de estiramiento y retroceso a la piel se componen predominantemente de una elastina núcleo (90%) rodeado de microfibrillas de fibrilina. La elastina se expresa como tropoelastina hidrofóbica soluble, rica en prolina, valina, lisina, alanina, glicina, leucina e isoleucina, transferido al andamio de microfibras, y reticulado por la lisil oxidasa y la transglutamida. Las fibrilinas son ricas en cisteína, altamente unidas a disulfuro glicoproteínas, con crecimiento epidérmico de unión a calcio factor como dominios. Son secretados en pro-formas, ensamblado en microfibrillas, y asociado con otras glicoproteínas asociadas a microfibrillas. La pérdida de fibras de elastina adecuadas se produce con la exposición de la piel a la radiación ultravioleta. La radiación ultravioleta también agota la red de

microfibrillas en la capa epidérmica-dérmica y dermis, que contribuye a las fibras elásticas aberrantes⁴⁰.

2.6.1.2. Colagenasa

Grupo de moléculas muy versátiles por la gran cantidad de procesos en los que están implicadas en el organismo, son enzimas que tienen la capacidad de romper enlaces peptídicos de colágeno a pH fisiológico. Pertenecen a la familia de las metaloproteinasas de matriz; participan en procesos fisiológicos de los que depende la integridad del colágeno o su reordenamiento. En la piel humana se han identificado tres colagenasas, MMP-1, MMP-8 y MMP-13, capaces de iniciar la degradación de colágeno fibrilar de tipo I.

- a) MMP-1, es la colagenasa intersticial más abundante y sus sustratos moleculares son capaces de degradar el colágeno de tipo I y III. Su función principal corresponde al recambio normal de colágeno, pero su actividad se incrementa para lograr la remodelación de la matriz extracelular durante la cicatrización de las heridas³⁹.

2.7. La radiación ultravioleta (UV)

La tierra es continuamente irradiada por fotones de luz provenientes del sol como, la luz infrarroja (780-5000 nm), luz visible (400-780 nm) y luz UV (290-400 nm). Aproximadamente el 5% de la energía radiante del sol se emite en el rango UV y se divide en tres categorías que dependen de la longitud de onda, UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) y UVA (320-400 nm).

La radiación UVC: es extremadamente dañina para la piel debido a que estas longitudes de onda tienen una energía enorme e inducen estrés genotóxico. Afortunadamente, se evita que la radiación UVC llegue a la tierra, ya que es absorbido en gran medida por la capa de ozono atmosférica^{41, 42}.

La radiación UVB: constituye solo alrededor del 4-5% de la radiación UV, siendo aun así la más genotóxica y capaz de causar mucho más daño celular que la radiación UVA, teniendo, sin embargo, menos poder de penetración que esta. Actúa principalmente en la capa basal epidérmica de la piel, induciendo quemaduras de sol, inflamación, daño en el ADN, estrés oxidativo, producción de radicales libres, inmunosupresión, fotoenvejecimiento y cáncer de piel^{42, 43, 44}.

La radiación UVA: representa >90% de la radiación UV total que llega a la superficie de la tierra⁴⁵. Se sabe que penetra más profundamente en la epidermis y la dermis y avanza con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁴⁶. La exposición crónica a los rayos UVA puede dañar las estructuras subyacentes de la dermis y causar un fotoenvejecimiento prematuro de la piel, como la flacidez y las arrugas de la piel^{47, 48}.

2.7.1. Mecanismo de acción de la radiación UV en la piel.

La radiación UV es uno de los principales causantes de daño a la piel y se cree que contribuye a una multiplicidad de consecuencias patológicas como daños en el ADN, inflamación, producción de ROS, inmunosupresión y fotocarcinogénesis⁴⁹. La radiación UVB daña las células de la piel a través de mecanismos indirectos por la formación de ROS. La sobreproducción de ROS resulta en estrés oxidativo un proceso que puede servir como un importante mediador de daño a las estructuras celulares, incluyendo lípidos y membranas, proteínas, y ADN^{42, 50}.

La radiación UV también causa daños estructurales al colágeno, que incluyen las siguientes acciones: cambios estructurales en la fenilalanina para generar tirosina (escisión estructural del -OH), descarboxilación (escisión estructural de -C-O), abstracción de hidrógeno (escisión estructural de -N-H), desnaturalización térmica y degradación oxidativa general⁵¹. Cualquier escisión de la cadena, que se produce en el colágeno, tiene el potencial de iniciar efectos de envejecimiento o acelerar la degradación, lo que lleva a cambios en la bioactividad del colágeno⁵².

Todos los niveles de organización estructural del colágeno experimentan cambios después de la exposición a la radiación UV-254 nm, la triple hélice del colágeno nativo es el primer objetivo estructural de la esta radiación. Durante la etapa temprana de la degradación del colágeno, caracterizada por la transición del triple hélice de colágeno a conformación de espiral al azar, asociada con la pérdida de agua; la triple hélice ayuda a proteger las cadenas de colágeno individuales contra la escisión del péptido. Una vez que se destruye la triple hélice de colágeno, se produce una escisión extensiva del enlace peptídico a través de reacciones de radicales libres (Figura 7)⁵³.

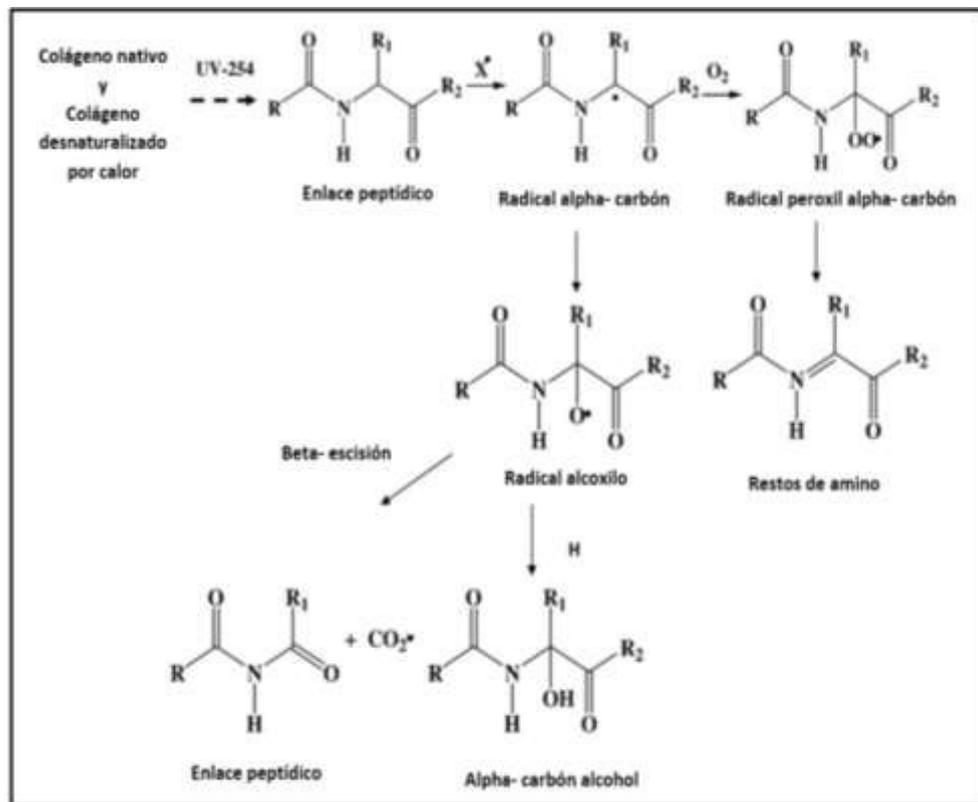


Figura 7. Posibles mecanismos de escisión de la columna vertebral de colágeno⁵³.

Por lo general, los antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos (AO) son capaces de inhibir la acción de ROS; pero a veces la exposición excesiva y crónica a la radiación UV hace que estas defensas sean inadecuadas, causando muchos efectos adversos, como el envejecimiento prematuro de la piel y el melanoma¹³. Como resultado

de esto, la producción de colagenasa, gelatinasa y estromelisina-1 se estimula y conduce al deterioro del colágeno, la elastina y otros componentes de la matriz extracelular dérmica⁵⁴. La proteína activadora 1 (AP-1) también inhibe el factor de crecimiento transformante- β (TGF β) que es un importante regulador para la producción de procolágeno tipo I en la piel humana⁵⁵. La alteración en la estructura de las fibras elásticas, posteriormente reduce las propiedades elásticas de la piel y da como resultado la formación de arrugas⁵⁶ (Figura 8).

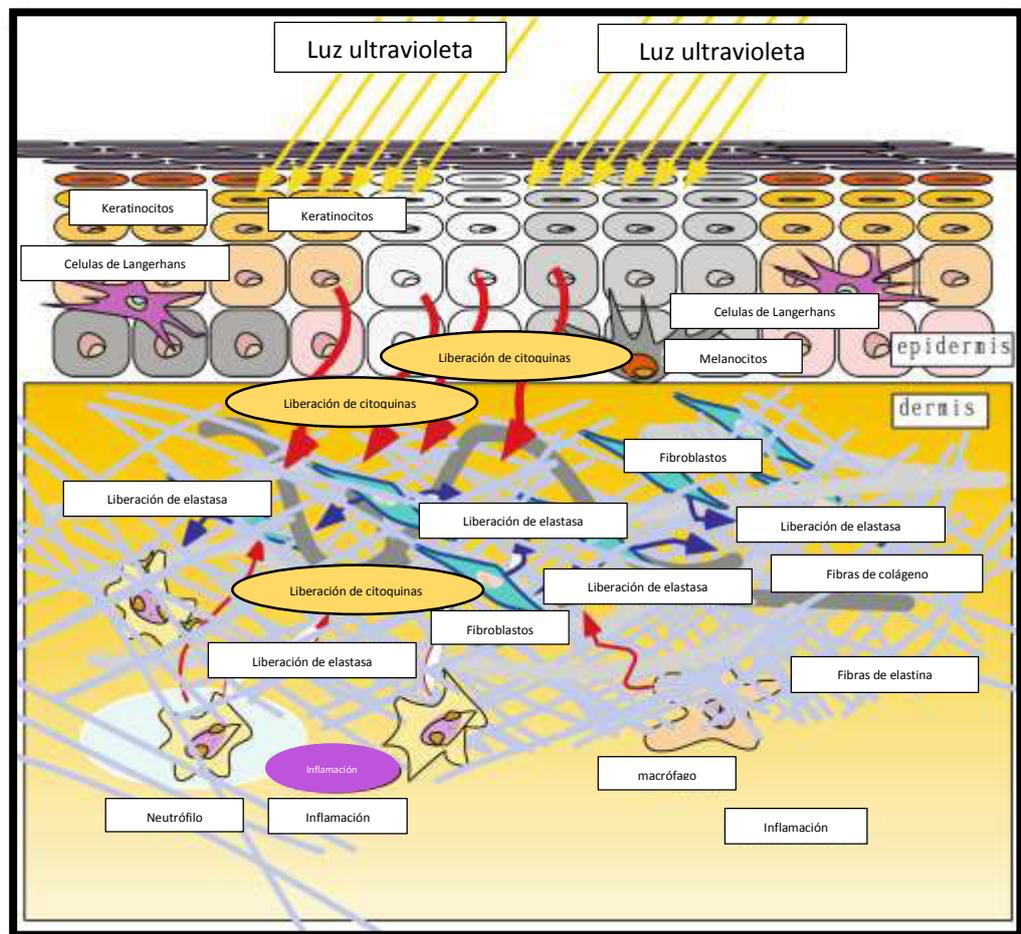


Figura 8. Mecanismos que subyacen a los cambios en la red tridimensional de fibras elásticas inducidas por la radiación UV⁵⁶.

2.8. Fotoprotección

Los productos de protección solar están diseñados principalmente para proteger la piel de los efectos nocivos de la radiación solar UV. Contienen moléculas o complejos moleculares que pueden absorber, reflejar o dispersar los fotones UV. Estos son protectores de pantallas solares. Además, recientemente se han desarrollado nuevas sustancias de protección solar que previenen, mejoran o incluso reparan el daño de la piel inducido por el sol. Finalmente, los protectores solares deben ser seguros no solo para los humanos que los aplican sobre las partes expuestas del cuerpo sino también para el medio ambiente, que indirectamente los recibe durante la eliminación⁵⁷.

2.8.1. Fotoprotectores químicos u orgánicos

Son sustancias de síntesis, generalmente compuestos aromáticos conjugados con grupos carbonilo, que absorben la energía transportada por los fotones de las radiaciones UV y, por tanto, pueden considerarse cromóforos exógenos. Estas moléculas excitadas regresan a su estado inicial liberando el exceso de energía en forma de calor imperceptible, de fluorescencia o mediante transferencia a moléculas adyacentes⁵⁸.

Según su espectro de absorción pueden dividirse en:

Fotoprotectores UVB: incluyen el ácido paraaminobenzoico (PABA) y sus ésteres (padimato A y O), los cinamatos, los salicilatos y el octocrileno. Todos ellos bloquean de forma eficaz alrededor del 90 % de las radiaciones UVB en su espectro completo (290-320 nm) y, por tanto, ofrecen protección frente a la quemadura y el eritema inducidos por estas radiaciones⁵⁹.

Fotoprotectores UVA: la mayoría de los filtros de la radiación UVA absorben también algo de UVB. Incluyen las benzofenonas, las antralininas, la avobenzona y el ácido tereftaliden-dialcanfor sulfónico (Mexoryl SX)⁵⁹.

2.8.2. Fotoprotectores inorgánicos o pantallas minerales

Son polvos inertes constituidos por pequeñas partículas de 180 a 250 nm de dióxido de titanio (TiO₂), óxido de cinc (ZnO), óxido de hierro (Fe₂O₃), óxido de magnesio (MgO), mica o talco. La capacidad de estos minerales de bloquear la radiación viene determinada por varias propiedades físicas que son el índice de refringencia, el tamaño de las partículas y la dispersión según el espesor de la película⁶⁰. Sirven como barrera física que refleja y dispersa las radiaciones solares, cualquiera que sea su longitud de onda. Por esta propiedad también se les ha llamado filtros físicos⁶¹.

2.8.3. Protectores solares naturales

Así, en los últimos años se aborda el gran interés de la fotoprotección en el uso de productos naturales para su mayor tolerabilidad y por su impacto ambiental insignificante¹³. Aunque el envejecimiento cronológico no se puede tratar, el fotoenvejecimiento si se puede tratar con compuestos o productos con propiedades antioxidantes. Los antioxidantes, que también son carroñeros de radicales libres, se están explorando para prevenir el fotoenvejecimiento debido a su capacidad para inhibir la expresión y la actividad de las MMP. Estos compuestos, contrarrestan el daño oxidativo que se produce en nuestra piel en la vida diaria⁶². Los antioxidantes, que *a priori* poseen tan buenas cualidades para la fotoprotección, presentan el inconveniente de ser moléculas muy reactivas y, por tanto, muy inestables. Por esta razón, su formulación es difícil y, además, para que sean efectivos han de emplearse a concentraciones elevadas. Por último, si su función es la de barrer los radicales libres producidos en la piel durante la exposición al sol, deben penetrar en ella en profundidad y estar presentes en forma activa cuando sean generados dichos radicales. Los antioxidantes tópicos proporcionan varias ventajas para la fotoprotección frente a su administración oral, ya que actúan directamente sobre la piel, alcanzado concentraciones suficientes⁶³.

2.8.4. Estudios de estabilidad

Según la Monografía de la International Federation of Societies of Cosmetic Chemists – IFSCC, la prueba de estabilidad es considerada un procedimiento predictivo, basado en datos obtenidos de productos almacenados en condiciones que buscan acelerar alteraciones posibles de suceder en las condiciones de mercado. Como en todo procedimiento predictivo los resultados no son absolutos, pero tienen probabilidad de suceder.

El estudio de la estabilidad de productos cosméticos proporciona informaciones que indican el grado de estabilidad relativa de un producto en las variadas condiciones a las que pueda estar sujeto desde su fabricación hasta su expiración.

2.8.4.1 Factores que influyen en la estabilidad

Cada componente, activo o no, puede afectar la estabilidad de un producto. Variables relacionadas a la formulación, al proceso de fabricación, al material de acondicionamiento y a las condiciones ambientales y de transporte pueden influir en la estabilidad del producto. Conforme al origen, las alteraciones pueden ser clasificadas como extrínsecas, cuando son determinadas por factores externos; o intrínsecas, cuando son determinadas por factores inherentes a la formulación.

- a) Extrínsecos: Tiempo, temperatura, luz, oxígeno, humedad, material de acondicionamiento, microorganismos, vibración.
- b) Intrínsecos: Incompatibilidad física, incompatibilidad química (pH, reacciones de oxidación-reducción, hidrólisis, interacción entre los ingredientes de la formulación, interacción con el material de acondicionamiento)⁶⁴.

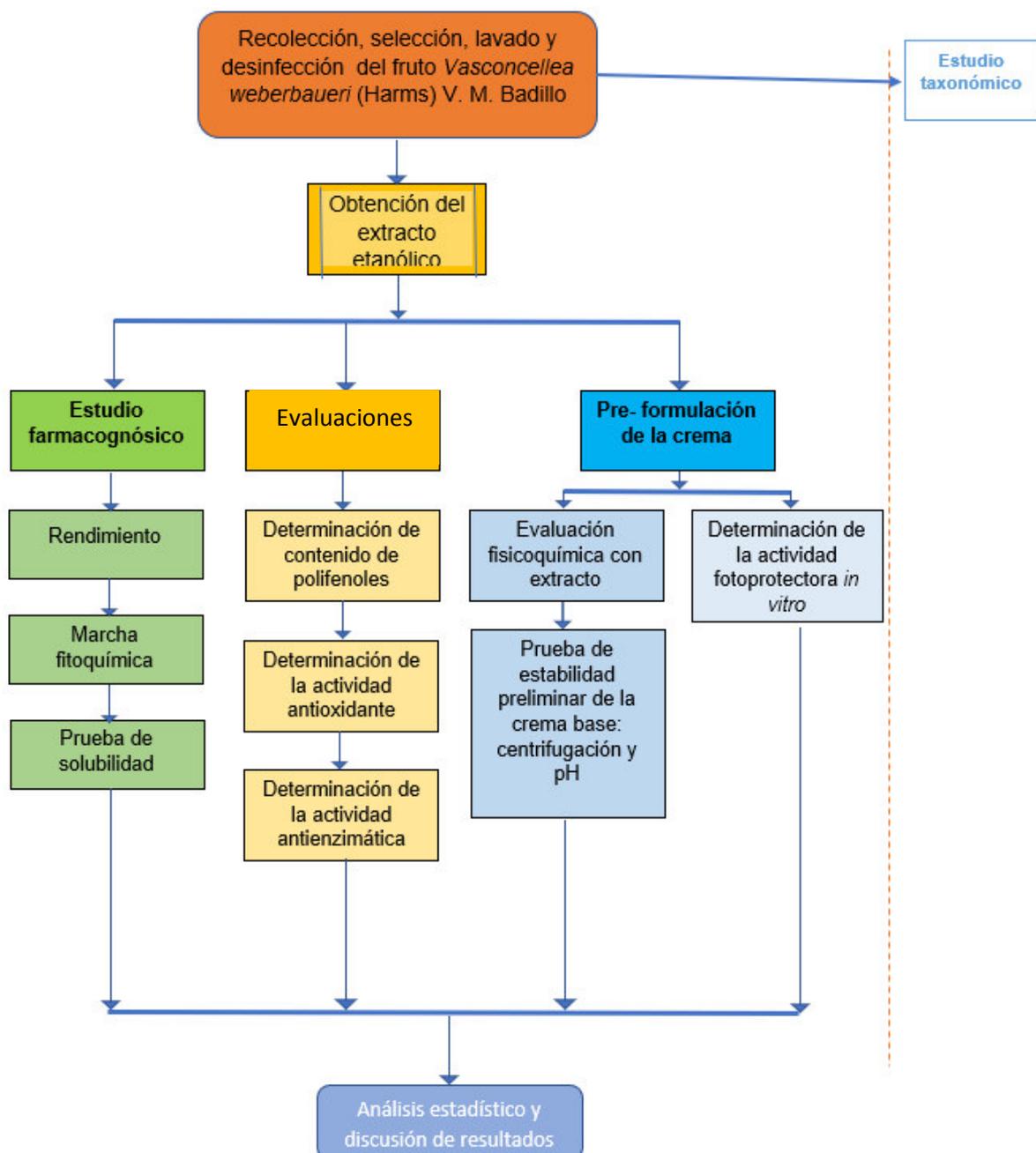
III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Metodología

3.1.1. Tipo de estudio

Experimental, prospectivo y transversal.

3.1.2. Flujoograma del trabajo experimental



3.2. Materiales

3.2.1. Materiales de laboratorio

- Materiales de vidrio (tubos de ensayo, placa de toques, matraces, probetas, vasos de precipitado, fiolas, pipetas, luna de reloj, embudos, baguetas)
- Materiales de plástico (espátulas, cubetas, gradillas, embudo, puntas para micropipeta)
- Materiales de fierro (soporte universal, pinzas)
- Materiales de cerámica (embudo Buchner, mortero)
- Cubeta de cuarzo,
- Útiles de seguridad personal (guantes de látex, mascarilla simple, lentes de protección, mandil).
- Otros (papel Whatman N°42, papel filtro, papel de aluminio, algodón)

3.2.2. Equipos

- Evaporador rotatorio DLAB RE 100-Pro.
- Bomba de vacío VAS ÉS FÉMIPARI KTSZ SZEGED.
- Balanza analítica OHAUS sensibilidad 0,1 mg.
- Centrífuga SMART R17.
- Espectrofotómetro GENESYSTEM 10S UV-VIS.
- Cocinilla eléctrica.
- Refrigeradora Samsung Modelo ES21HKLMR.
- Estufa acoplada a un termómetro Labor Muszeripari Muvek (Esztergom) modelo 68-33884.
- Baño maría Memmert, ultrasonido ULTRASON-S-H, pHmetro MILL WAUKEE- MI-151.
- Micropipeta marca CAPP DENMARK capacidades: 20-100 μ L y 100-1000 μ L.

3.2.3. Reactivos

- **Reactivos químicos:**

- reactivo de Folin-Ciocalteu,
- carbonato de sodio,
- ácido gálico,
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH),
- etanol 96°,
- metanol,
- n-butanol,
- β,β' - azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS),
- persulfato de potasio,
- ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox®)
- buffer THAM Sigma 7-9® 0.1 M pH 8.0, buffer fosfato 0.1 M pH 6.5,
- N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAAPVN),
- buffer Tris-Glicine 50mM con 400mM NaCl y 10mM CaCl₂ pH 7.5,
- N-[3-(2- furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA),
- ácido fórmico 10 %,
- formol neutro.

Los reactivos son de grado analítico y se adquirieron de las casas comerciales MERCK y SIGMA.

- **Reactivos biológicos:**

- enzima elastasa pancreática porcina,
- enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum*.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las casas SIGMA y MERCK.

3.3. Métodos

3.3.3. Colecta e identificación del material biológico

Los frutos de la especie *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo se recolectaron en el Departamento de Amazonas, Provincia de Chachapoyas, Distrito de Granada ubicado a 3 013 metros de altitud, con temperatura promedio de 18°C y humedad relativa de 74%¹⁷ el 7 de enero del 2018. La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3.4. Obtención del extracto

El material recolectado fue lavado con agua destilada para limpiarlo de tierra e impurezas y desinfectado con alcohol. Un aproximado de 695 g del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, previamente disminuidos de tamaño, fueron macerados en 1000 mL de etanol de 96° durante 15 días, al amparo de la luz y el calor.

Posteriormente se filtró el extracto al vacío, hasta agotamiento, con papel Whatman N° 42 y se concentró en un evaporador rotatorio a una temperatura de 45°C.

3.3.5. Prueba de solubilidad

El extracto se sometió a un ensayo de solubilidad con solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, n-butanol, etanol, metanol, agua destilada. Se agitó y observó los resultados.

3.3.6. Marcha Fitoquímica

La marcha fitoquímica del extracto se realizó empleando reactivos de coloración y precipitación⁶⁵.

3.3.5. Determinación del contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

3.3.5.1. Fundamento

El método se basa en la determinación fotocolorimétrica usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual contiene molibdato y tungstato sódico que al reaccionar con los fenoles forma el complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ($W_8 O_{23}$) y molibdeno ($Mo_8 O_{23}$) que tienen un máximo de absorción a 765 nm.

3.3.5.2. Preparación de la muestra

Se pesó 0,2g de muestra en 5mL de metanol al 70% a 70°C. Se agitó por 10 minutos se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 350 rpm por 10 minutos. Luego se separó el sobrenadante en un tubo graduado. Se ajustó el volumen a 10mL con metanol al 70% frío. Se diluyó 4mL del extracto con agua hasta 100mL.

3.3.5.3. Procedimiento

En un tubo de ensayo se colocó 100 μ L de la muestra problema y 500 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 0,2N. Se agregó 400 μ L de carbonato de sodio 7,5% w/v. Se agitó y dejó en reposo durante una hora en oscuridad. Finalizado el tiempo, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de luz UV-Vis a 765nm contra agua.

El valor de los polifenoles totales será expresado como equivalentes de ácido gálico/ g de material⁶⁶.

3.3.6. Determinación de la actividad antioxidante por el método de 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

3.3.6.1. Fundamento

El radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es de coloración violeta; en presencia de una sustancia captadora de radicales libres el compuesto reacciona y se decolora a amarillo pálido. La reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométricamente a 517 nm. La actividad antioxidante de una muestra expresa el IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir en un 50 % al DPPH).

3.3.6.2. Preparación de la muestra

Se realizaron diluciones de la muestra a las concentraciones de 16,67, 50, 116,67, 183,33, 250 µg/mL, haciendo uso de etanol de 96° como solvente.

3.3.6.3. Preparación de la solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Se pesó 20mg de DPPH y se disolvió en 50mL de metanol para obtener una solución stock. Se preparó la solución de trabajo de DPPH, midiéndose 1,7 mL de la solución stock de DPPH para llevarlo a un volumen final de 20 ml con metanol, se midió la absorbancia final a una longitud de 517 nm para obtener absorbancia entre 0,600 – 0,700 nm ± 0.02.

3.3.6.4. Procedimiento

Luego de la obtención de la solución de trabajo DPPH. Se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contiene 400µL del solvente de la muestra problema y 800µL de metanol. En un tubo de ensayo se colocó 400µL de la muestra problema y 800µL de la solución de trabajo de DPPH, se procedió a agitar y dejar en reposo durante 30 minutos alejado de la luz. Se leyó

las absorbancias a 517nm y se realizó el mismo procedimiento para el control de DPPH en donde se reemplaza la muestra problema por su solvente, así lo mismo para la sustancia patrón Trolox. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{Abs.DPPH} - \text{Abs.muestra}) / (\text{Abs.DPPH}) \times 100$$

Se determinó el valor TEAC según la siguiente fórmula:

$$\text{TEAC} = \text{IC 50 Trolox } \mu\text{g/mL} / \text{IC 50 DPPH muestra mg/mL}$$

3.3.7. Determinación de la actividad antioxidante por el método de β , β' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+})

3.3.7.1. Fundamento

El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo de color verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del β , β' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) con persulfato de potasio. En presencia de una sustancia captadora de radicales libres el compuesto reacciona y se decolora a amarillo pálido. La reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométricamente a 734 nm. La actividad antioxidante de la muestra se expresa en IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir en un 50 % el ABTS^{•+}).

3.3.7.2. Preparación de la muestra

Se realizaron diluciones de la muestra a las concentraciones de 40, 80, 120, 160 $\mu\text{g/mL}$, haciendo uso de etanol de 96° como solvente.

3.3.7.3. Preparación de la solución stock de β , β' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+})

Se preparó una solución stock de ABTS^{•+} 7Mm, para su activación se añadió persulfato de potasio para una concentración final de 2,45 mM y se dejó reaccionar por 16 horas a temperatura ambiente y alejado de la luz. Finalmente, se diluyó la solución stock de ABTS^{•+} en agua bidestilada hasta obtener una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm^{67} .

3.3.6.4. Procedimiento

Luego de obtener la solución de trabajo ABTS^{•+}, se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contenía 20 μL del solvente de la muestra problema y 980 μL de agua bidestilada. Se colocó en un tubo de ensayo 20 μL de la muestra problema y 980 μL de la solución de trabajo de ABTS^{•+}. Posteriormente se agitó y dejó en reposo durante 7 minutos alejado de la luz. Se leyó las absorbancias a 734 nm, realizando el mismo procedimiento para el control de ABTS^{•+} en donde se reemplaza la muestra problema por su solvente. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{Abs. ABTS} - \text{Abs. muestra}) / (\text{Abs. ABTS}) \times 100$$

Se determinó el valor TEAC según la siguiente formula:

$$\text{TEAC} = \text{IC 50 Trolox } \mu\text{g/mL} / \text{IC 50 ABTS muestra mg/mL}$$

3.3.8. Determinación de la actividad anticolagenasa

3.3.8.1. Fundamento

Se determina la capacidad de una muestra de inhibir la actividad de la enzima colagenasa en la siguiente reacción:



Donde:

FALGPA = N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala

FAL = N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu

La inhibición de la enzima colagenasa se demuestra al obtener menor cantidad del producto de reacción para lo cual se mide su absorbancia a 348 nm.

3.3.8.1. Procedimiento

En un tubo de ensayo con 100µL de la muestra de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo y 210µL de la solución de enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum*, se incubó durante 15 minutos a temperatura de 37°C. Se agregó 190µL de la solución del sustrato N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), e incubó durante 5 minutos a temperatura de 37°C para que la reacción enzima-sustrato se lleve a cabo. Se añadió una gota de ácido fórmico 10% para detener la reacción enzima-sustrato; por último, se leyó las absorbancias en un espectrofotómetro de luz UV-Visible a una longitud de onda de 348nm⁶⁸.

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{Abs.control} - \text{Abs.muestra}) / (\text{Abs.control}) \times 100$$

3.3.9. Determinación de la actividad antielastasa

3.3.9.1. Fundamento

Se determina la capacidad de una muestra problema de inhibir la actividad de la enzima elastasa en la siguiente reacción:



Donde:

SucAla3-pNA = N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide

SucAla3 = N-succinyl-Ala-Ala-Ala

La inhibición de la enzima elastasa se demuestra siguiendo la liberación de p-nitroanilide, el cual presenta una coloración amarillo pálido y su absorbancia se mide a 410 nm.

3.3.9.2. Procedimiento

Se colocó en tubo de ensayo 100µL de buffer THAM, pH 8.0 y se agregó 50µL de la muestra problema con 100µL de la solución de trabajo de enzima elastasa pancreática porcina (concentración en tubo de reacción de 1µg/mL), se incubó durante 15 minutos a temperatura de 34°C. Se agregó 250µL de la solución del sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAAPVN, concentración en tubo de reacción de 0,8mM). Se incubó durante 11 minutos a temperatura de 34°C para que la reacción enzima-sustrato se lleve a cabo. Con una gota de ácido fórmico 10% se detuvo la reacción enzima-sustrato. Se leyó las absorbancias en un espectrofotómetro de luz UV-Visible a una longitud de onda de 410nm⁶⁸.

Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = ((\text{Abs.control} - \text{Abs.muestra})) / (\text{Abs.control}) \times 100$$

3.3.10. Pre-formulación de cremas dermocosméticas

Se elaboraron tres cremas conteniendo el extracto etanólico a concentraciones de 1, 3 y 5% respectivamente. Tal como muestra la Tabla 4. El proceso de fabricación se encuentra en el Anexo 2.

Tabla 4. Pre-formulación de las cremas dermocosméticas del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

PRE - FORMULACION	Crema base	Crema base + extracto al 1%	Crema base + extracto al 3%	Crema base + extracto al 5%
1 ETAPA				
agua desionizada	X	X	X	X
lanette SX	X	X	X	X
vaselina liquida	X	X	X	X
palmitato de isopropilo	X	X	X	X
carbomer	X	X	X	X
Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Butylparaben (and) Isobutylparaben	X	X	X	X
trietalonamina	X	X	X	X
Pentaerythrityl Tetra-di-t-butyl Hydroxyhydrocinnamate	X	X	X	X
EDTA	X	X	X	X
2 ETAPA				
Crema base	-	19.2	17.6	16
Extracto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i>	-	0.2	0.6	1
Propilenglicol	-	0.6	1.8	3
Total		20	20	20

3.3.10.1. Análisis organoléptico y fisicoquímico del producto terminado

Se realizó el análisis organoléptico y fisicoquímico de las formulaciones tomando en cuenta el aspecto, color, olor y pH.

3.3.10.2. Determinación de pH

Se prepararon soluciones acuosas de las formulaciones al 10% p/v. Las muestras fueron calentadas a 70 °C por 5 minutos, enfriadas a temperaturas ambiente y filtradas en papel filtro. Se determinó el pH del filtrado utilizando un pH metro digital⁶⁹.

3.3.11. Estabilidad preliminar

3.3.11.1. Prueba de Centrifugación

Las cremas elaboradas fueron sometidas a 3 000 rpm durante 30 minutos a condiciones ambientales para verificar si se mantiene estable la formulación o si requiere una nueva reformulación antes de iniciar con la prueba de estabilidad preliminar.

3.3.11.2. Condiciones de almacenamiento:

- El producto se acondicionó en frascos de vidrio neutro, transparente, con tapa hermético.
- La cantidad del producto no debía superar los dos tercios del volumen del frasco y se debe evitar la incorporación de aire.
- La duración del estudio fue de 15 días.

Generalmente las muestras son sometidas a calentamiento en estufas, enfriamiento en refrigeradores y a ciclos alternados de enfriamiento y calentamiento.

- El valor adoptado para temperaturas elevadas fue:

$$\mathbf{G1: T = 45 \pm 2.}$$

- El valor adoptado para bajas temperaturas fue:

$$\mathbf{G2: T = -5 \pm 2.}$$

- El valor adoptado para los ciclos fue:

$$\mathbf{G3: 24 \text{ horas a } 45 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C y 24 horas a } -5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C – durante 15 días (6 ciclos)}^{64}.$$

3.3.12. Determinación *in vitro* del Factor de Protección Solar (FPS) por el método de Mansur y col. y Sayre y col.

El FPS se evaluó en el rango de 290 a 320 nm (rango UVB), mas no en el rango UVA ni UVC. Para obtener las muestras diluidas de las formulaciones (0,2 mg/mL), se pesó 1,0 g de las formulaciones y se transfirió a un matraz aforado de 100 ml con 50 mL de etanol, se agitó por 5 minutos, y luego se diluyó a volumen con etanol; se homogenizó y filtró descartando los primeros 10 mL. Una alícuota de 5,0 mL del filtrado se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se diluyó a volumen con etanol. Luego una alícuota de 5,0 mL de la última dilución se transfirió a un matraz aforado de 25 mL y se llevó a volumen con etanol.

$$\mathbf{FPS = FC \times \sum_{290}^{320} \times EE (\lambda) \times I (\lambda) \times Abs (\lambda)}$$

Donde:

FPS = Factor de Protección solar

FC = 10 (factor de corrección)

EE (λ) = Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ

I (λ) = Intensidad del sol en la longitud de onda λ

Abs (λ) = Absorbancia de la solución en la longitud de onda λ

Las absorbancias de las soluciones fueron determinadas en el rango de 290 a 320 nm, con intervalos de 5 nm (*Ver Tabla 5*), utilizando una cubeta de cuarzo de 1cm. Los análisis son realizados por triplicado y el FPS es calculado de acuerdo con la ecuación desarrollada por Mansur y col.⁷⁰.

Tabla 5. Relación entre el efecto eritemogénico (EE) y la intensidad de radiación (I) de cada longitud de onda (λ)⁷⁰.

Longitud de onda (nm)	290	295	300	305	310	315	320	TOTAL
EE (λ) x I (λ)	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0839	0,0180	1,000

3.4. Análisis estadístico

Se realizó la aplicación de análisis de varianza (ANOVA) para ver si todos los grupos presentaban diferencia significativa en la evaluación de la actividad antioxidante y antienzimática a través del método de tuckey con un nivel de confianza de un 95%. Se usó el programa SPSS versión 23.

IV. RESULTADOS

4.1. Estudio Farmacognóstico

4.1.1. Ensayo organoléptico

Tabla 6. Características organolépticas del extracto etanólico de los frutos de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Características	Especificación
Aspecto	Líquido parduzco
Color	Anaranjado
Olor	Característico

4.1.2. Rendimiento del extracto

Tabla 7. Rendimiento del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo

Muestra	Cantidad de muestra fresca (g)	Cantidad de extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
<i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo	695	16,35	2,35

4.1.3. Solubilidad del extracto

Tabla 8. Prueba de solubilidades del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Solvente	Solubilidad
Agua	++
Metanol	++
Etanol	+++
n-butanol	-
1,2-diclorometano	-
Éter etílico	-

Leyenda: (++++) alta evidencia; (+++) mediana evidencia; (+) poca evidencia; (-) negativo.

4.2. Estudio fitoquímico

Los resultados obtenidos del estudio fitoquímico se muestran a continuación:

Tabla 9. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

PRUEBA	METABOLITOS SECUNDARIOS	RESULTADO	CALIFICACIÓN
FeCl ₃	Compuestos fenólicos	Coloración verde o azul	++
Shinoda	Flavonoides	Coloración rojiza intensa	+++
Gelatina	Taninos	Ligeramente blancuzco	+
Lieberman - Burchard	Triterpenoides	Anillo pardo	+++
	Esteroides	Coloración rojiza a verde	-
Índice de espuma	Saponinas	1 cm persistente	+
Borntrager	Antraquinonas	Color rojo	+
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado naranja	-
Bertrand	Alcaloides	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-
Mayer	Alcaloides	Precipitado blanco	-

Leyenda: (++++) alta evidencia; (+++) mediana evidencia; (+) poca evidencia; (-) negativo.

4.3. Determinación de polifenoles totales Método de Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Contenido de polifenoles del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Parámetros	Resultados
Absorbancias	0,333
	0,331
	0,404
Promedio absorbancias	0,356
GAE (µg/ L)	58,69
mg GAE/ g Extracto	7,355

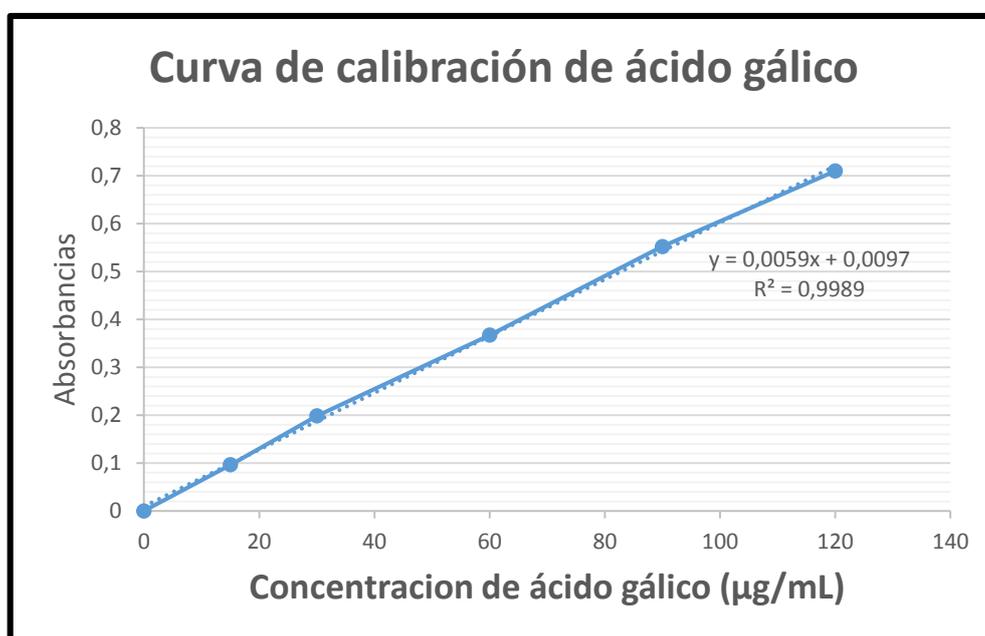


Figura 9. Curva de Calibración del estándar de ácido gálico.

El resultado obtenido en nuestra investigación es de 7,355 mg GAE/g extracto en comparación con nuestro estándar de ácido gálico.

4.4. 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

En la tabla 11 se muestra los resultados de los ensayos de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Tabla 11. Resultados de la actividad antioxidante Trolox por el método DPPH

Concentración del Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	Inhibición (%) DPPH	IC 50 ($\mu\text{g/mL}$)
0	0,4706	0	IC 50 = 2,155
1	0,3583	23,8631	
1,67	0,2878	38,8440	
3,33	0,1082	77,0080	

Tabla 12. Resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo por el método de DPPH.

Concentración del extracto ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	Inhibición (%) DPPH	IC 50 ($\mu\text{g/mL}$)
0	0,4149	0	IC50 =158,303
16,67	0,3644	12,1555	
50	0,3374	18,6791	
116,67	0,2415	41,7811	
183,33	0,1763	57,5078	
250	0,1033	75,1024	

El IC50 fue 158,303 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo y del Trolox 2,155 $\mu\text{g/mL}$. El valor TEAC fue 13,6131 mg Trolox/g muestra para el extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo (Figuras del 10 – 11).

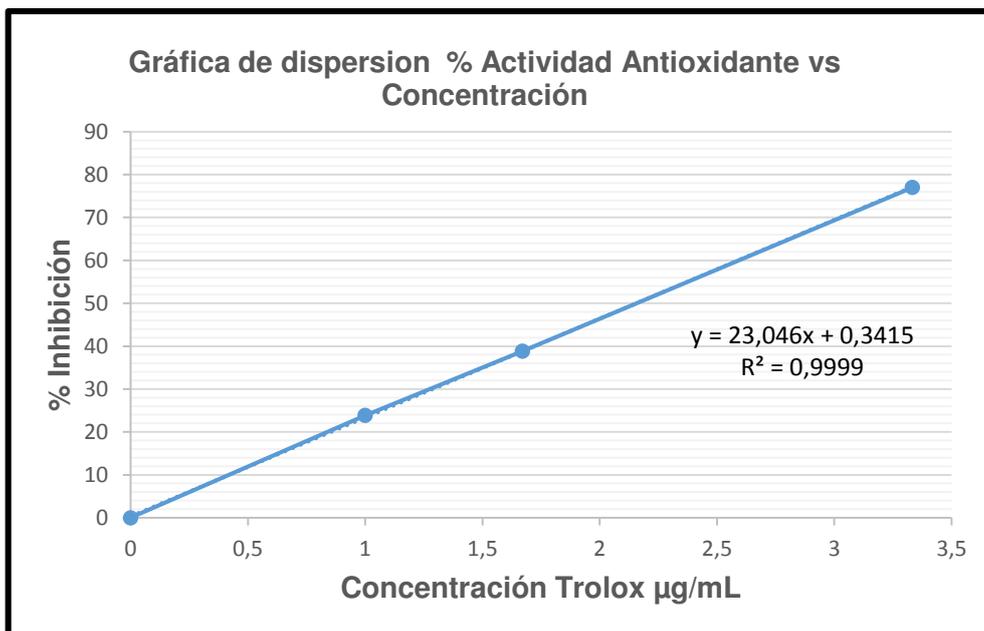


Figura 10. Gráfica de dispersión entre solución patrón de Trolox versus % de inhibición del radical DPPH.

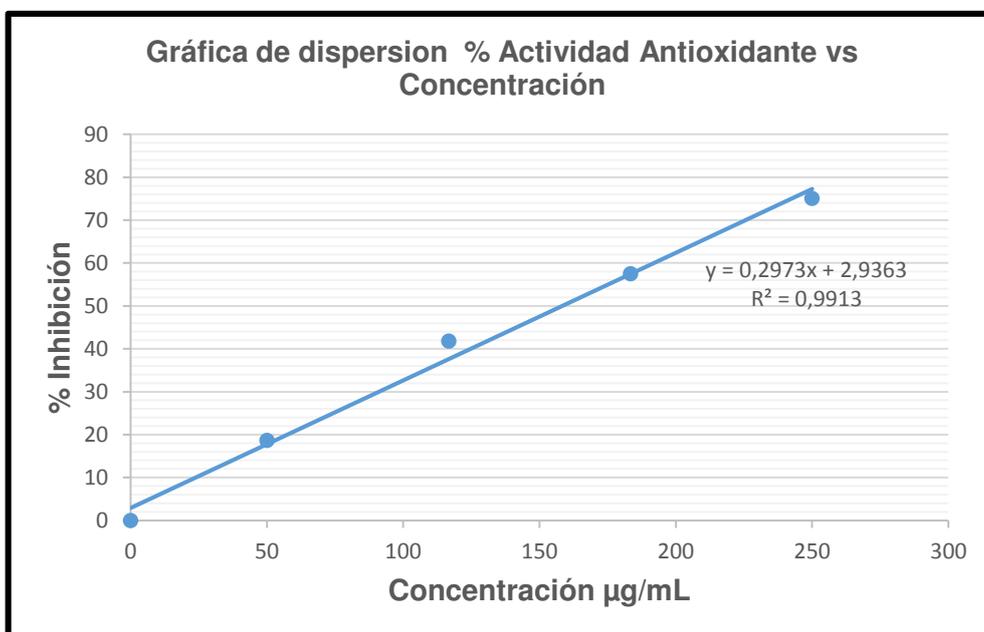


Figura 11. Gráfica de dispersión entre concentraciones del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo versus % de inhibición del radical DPPH.

4.5. Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+})

En la tabla 13 se muestra los resultados de los ensayos de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Tabla 13. Resultados de la actividad antioxidante Trolox por el método ABTS^{•+}.

Concentración Trolox (µg/mL)	Absorbancia a 734 nm	Inhibición (%) ABTS ^{•+}	IC 50 (µg/mL)
0	0,698	0	IC 50 = 2,5312
0,8	0,584	16,2583	
1,6	0,479	31,3512	
2,4	0,373	46,4919	
3,2	0,252	63,9108	

Tabla 14. Resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo por el método ABTS^{•+}.

Concentración del extracto (µg/mL)	Absorbancia	Inhibición (%) ABTS ^{•+}	IC 50 (µg/mL)
0	0,6471	0	IC50 =98,5051
40	0,5338	17,5131	
80	0,3607	44,2619	
120	0,236	63,5315	
160	0,1426	77,9644	

El IC50 fue 98,5051 µg/mL para el extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo y del Trolox 2,5312 µg/mL. El valor TEAC fue 25,6961 mg Trolox/g muestra para el extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo (Figuras del 12 – 13).

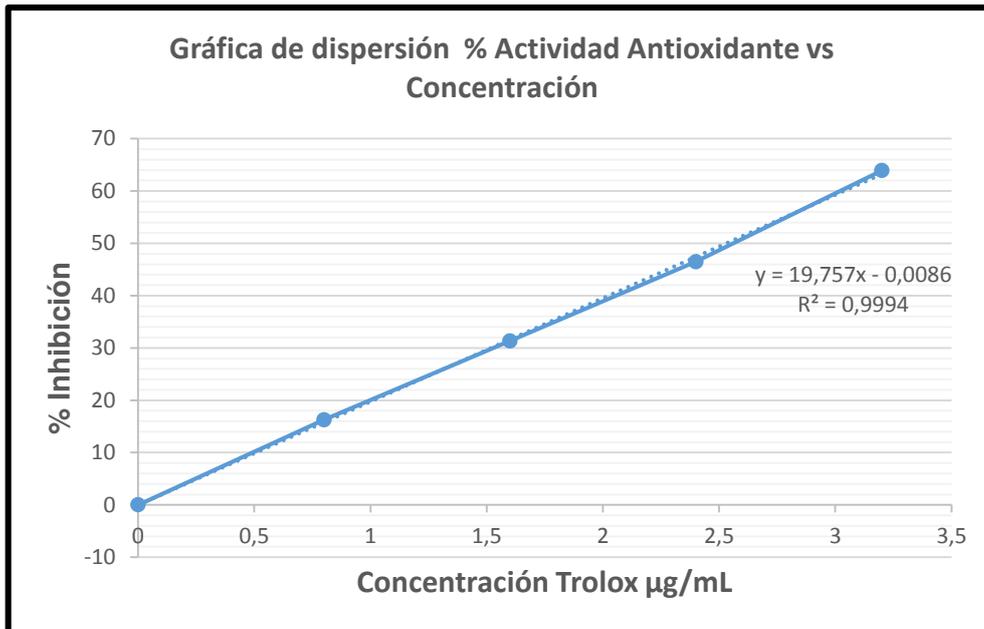


Figura 12. Gráfica de dispersión entre solución patrón de Trolox versus % de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$.

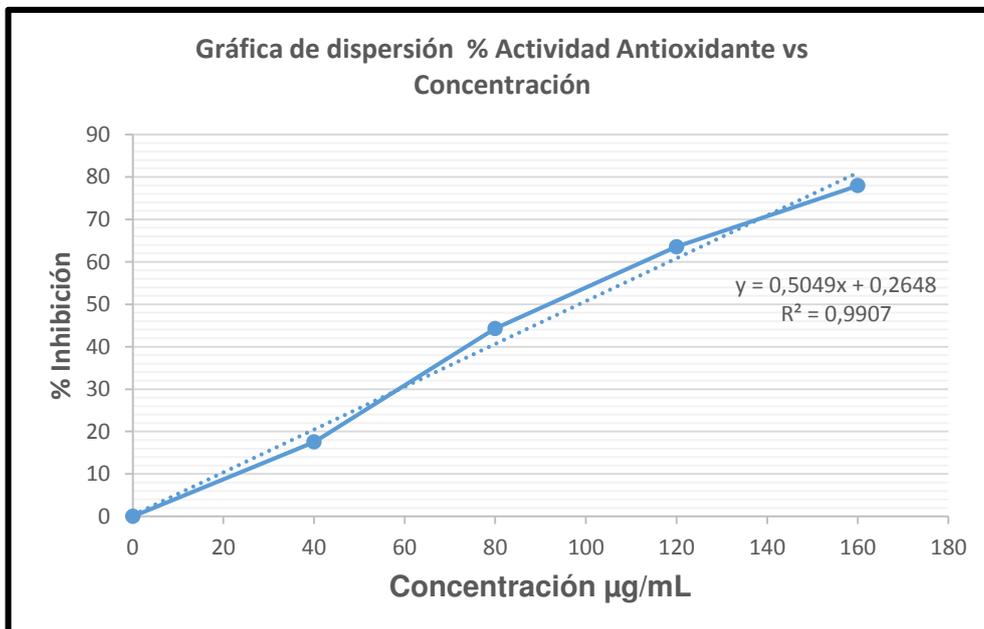


Figura 13. Gráfica de dispersión entre concentraciones del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo versus % de inhibición del radical $ABTS^{\bullet+}$.

4.6. Determinación de la actividad anticolagenasa

En la tabla 15 se muestra el porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del estándar Galato de epigalocatequina EGCG y en la tabla 16 se muestra los resultados de los ensayos de la actividad anticolagenasa del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del estándar galato de epigalocatequina (EGCG)

Concentración (µg/mL)	Absorbancia muestra	% Inhibición	IC 50 (µg/mL)
0	0,828	0	216,991
80	0,664	19,850	
160	0,497	39,940	
250	0,364	56,04	

Tabla 16. Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Concentración extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo. (mg/mL)	Absorbancia muestra	% Inhibición	IC 50 (mg/mL)
0	0,693	0	1,388
0,5	0,598	13,720	
1	0,456	34,093	
1,5	0,305	55,994	

Con relación al porcentaje de inhibición de enzima colagenasa de galato de epigalocatequina (EGCG) y del extracto etanólico; éste último mostró un IC50 de 1,388 mg/mL; y la EGCG un valor de 216,991 µg/mL.

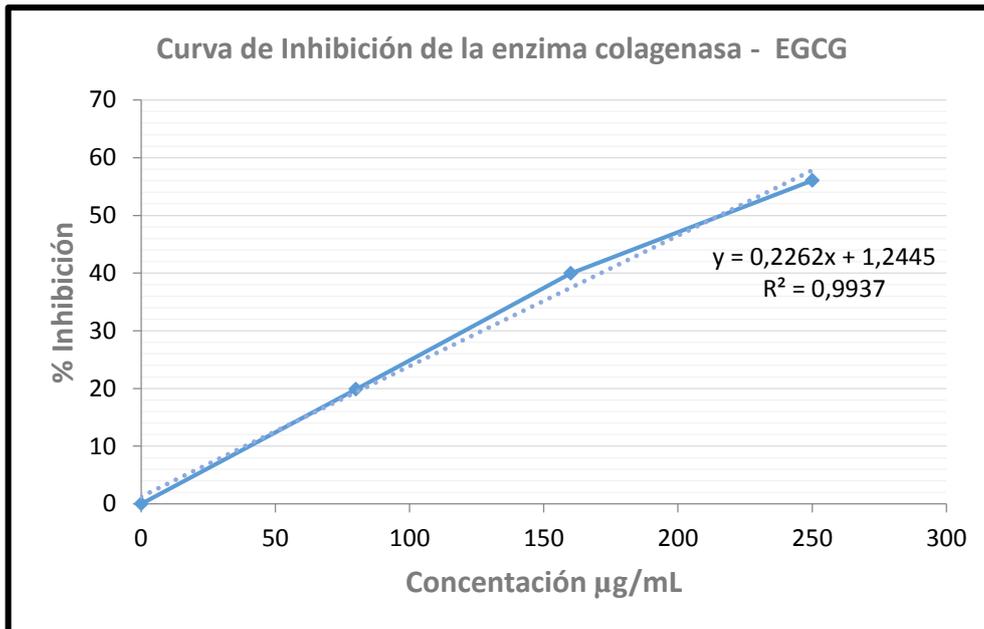


Figura 14. Curva de inhibición de colagenasa del estándar galato de epigalocatequina (EGCG)

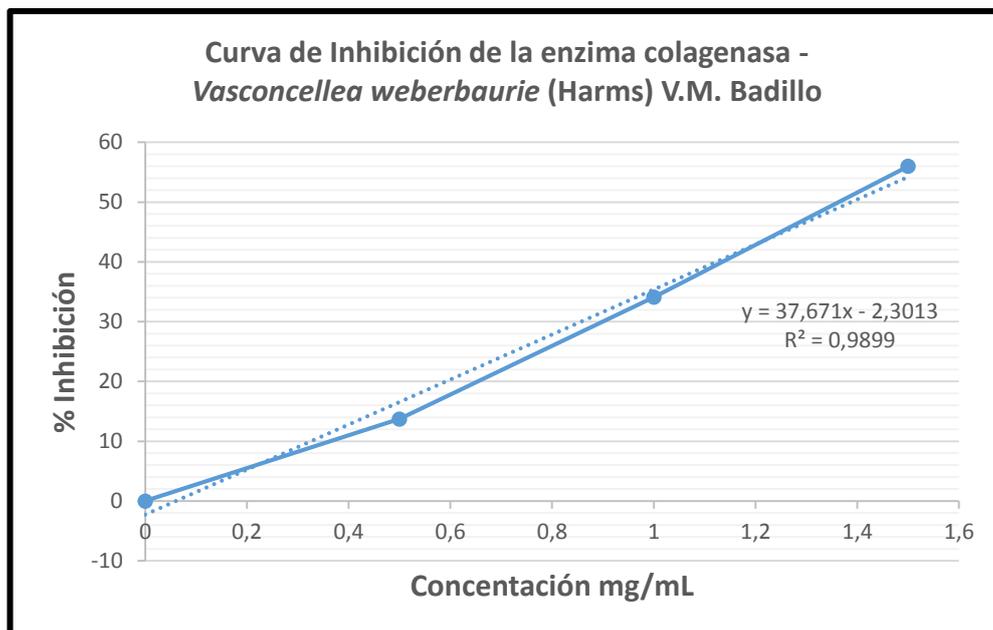


Figura 15. Curva de inhibición de colagenasa del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

4.7. Determinación de la actividad antielastasa

En la tabla 17 se muestra el porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del estándar Galato de epigalocatequina EGCG y en la tabla 18 se muestra los resultados de los ensayos de la actividad antielastasa del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Tabla 17. Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del estándar galato de epigalocatequina (EGCG).

Galato de epigalocatequina (µg/mL)	Absorbancia	% Inhibición	IC 50 (µg/mL)
0	0,110	0	12,1266
5	0,083	24,50	
10	0,065	40,91	
15	0,043	60,91	

Tabla 18. Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

Concentración extracto etanólico de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo (mg/mL)	Absorbancia muestra	% Inhibición	IC 50 (mg/mL)
0	0,3586	0	4,9278
2	0,2875	19,8132	
4	0,2081	41,9688	
6	0,143	60,1308	

Con relación al porcentaje de inhibición de enzima elastasa de galato de epigalocatequina (EGCG) y del extracto etanólico la enzima elastasa del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo; éste último mostró un IC50 de 4,9278 mg/mL; y la EGCG un valor de 12,1266 µg/mL.

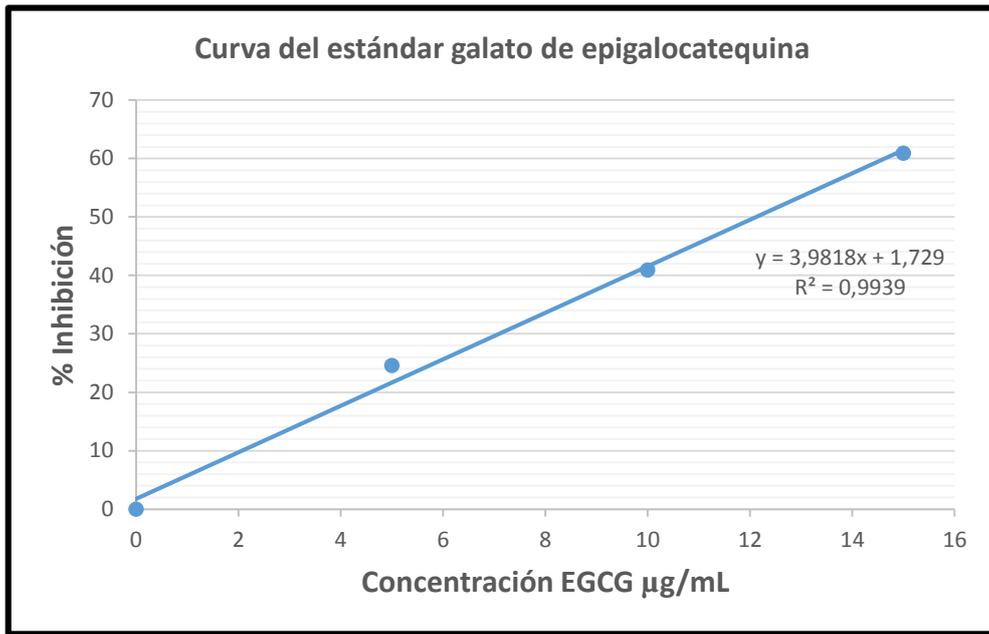


Figura 16. Curva de inhibición de elastasa del estándar de galato de epigalocatequina (EGCG).

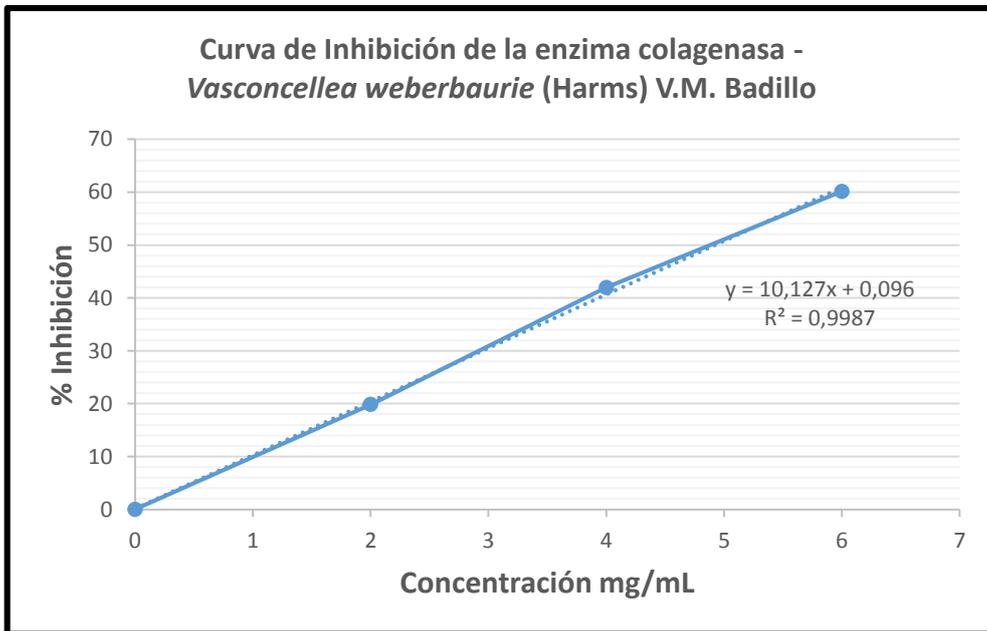


Figura 17. Curva de inhibición de elastasa del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

4.8. Pre-formulación de la crema.

En el Anexo 2 se observa el método de fabricación para las cremas elaboradas al 1, 3 y 5% a partir del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

4.8.1. Características organolépticas de la crema

Tabla 19. Características organolépticas de la crema elaborada a base del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

CARACTERÍSTICAS	1%	3%	5%
Aspecto	Crema	Crema	Crema
Color	Blanco amarillento	Amarillo parduzco	Marrón miel
Olor	Característico	Característico	Característico

4.8.2. Características fisicoquímicas

Tabla 20. pH de las cremas elaboradas a base del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

CARACTERÍSTICAS	1%	3%	5%
pH	4,38	4,60	4,72

4.8.3. Solubilidad de la crema

Tabla 21. Prueba de solubilidad de la crema.

agua	etanol	metanol	metanol-etanol	Etanol-DMSO	n-butanol
-	++	+	+	++++	+++

4.9. Determinación *in vitro* del factor de protección solar (FPS).

En la tabla 22 se observan valores de FPS de 0,4428 para la crema al 1%, 0,5565 al 3% y 0,5892 para el 5% y en la tabla 25 se observa valores de la crema al 5% luego del proceso de estabilidad preliminar.

Tabla 22. Valores FPS *in vitro* de las cremas elaboradas a las concentraciones de 1, 3 y 5%.

λ (nm)	EE (λ) x I(λ)	FORMULACIONES			
		C	C1 (1%)	C2 (3%)	C3 (5%)
290	0,0150	0,0449	0,0474	0,0620	0,0648
295	0,0817	0,0435	0,0464	0,0582	0,0627
300	0,2874	0,0426	0,0451	0,0566	0,0605
305	0,3278	0,0415	0,0440	0,0552	0,0589
310	0,1864	0,0408	0,0431	0,0550	0,0565
315	0,0839	0,0403	0,0429	0,0528	0,0552
320	0,018	0,0397	0,0425	0,0527	0,0542
FPS		0,4177	0,4428	0,5565	0,5892
SD		0,0002	0,0003	0,0008	0,0002
FPS final		0,4177 \pm 0,0002	0,4428 \pm 0,0003	0,5565 \pm 0,0008	0,5892 \pm 0,0002

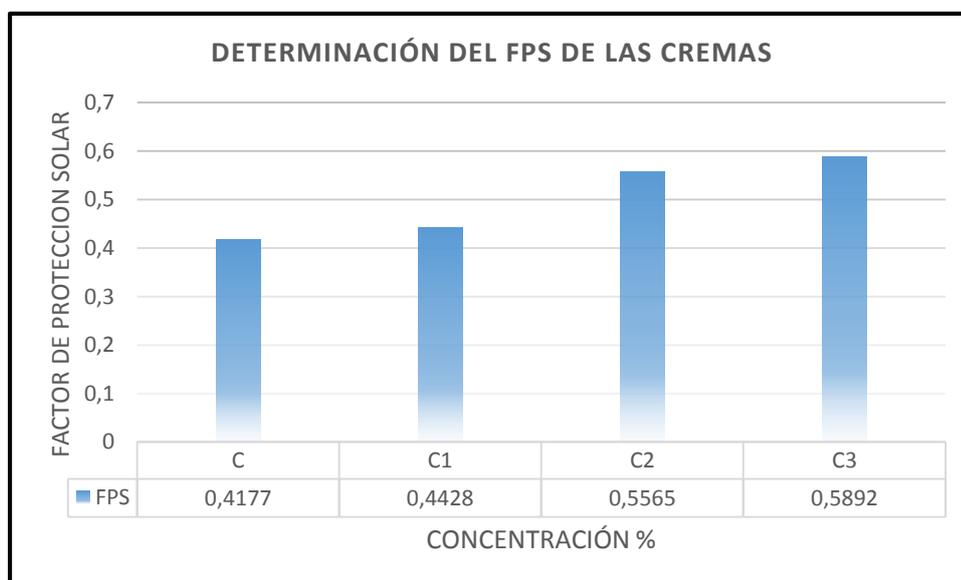


Figura 18. Nivel ascendente del FPS en cuanto a las concentraciones 1, 3 y 5% de las cremas en comparación con la crema base.

4.9.1. Estabilidad preliminar de la crema al 5%

Los resultados de la evaluación de las cremas con extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo (5 %) se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Resultados de la estabilidad preliminar de las cremas al 5%; a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$, 45 ± 2 y en ciclos de 24 horas (ciclos $45 \pm 2^\circ\text{C}$ y $4 \pm -5^\circ\text{C}$).

CREMA AL 5% <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo						
T°	Días	Aspecto	Color	Olor	pH 20,1 °C	Centrifugación (Separación de fases)
$-5 \pm 2^\circ\text{C}$	0	Cr	Mc	Ca	4,77	No hubo separación
	3	Cr	Mc	Ca	5,46	-
	6	Cr	Mc	Ca	4,84	
	9	Cr	Mc	Ca	4,88	
	12	Cr	Mc	Ca	4,92	
	15	Cr	Mc	Ca	4,80	
$45 \pm 2^\circ\text{C}$	0	Cr	Mc	Ca	4,77	No hubo separación
	3	Cr	Mc	Ca	5,05	-
	6	Cr	Mc	Ca	5,22	
	9	Cr	Mc	Ca	5,40	
	12	Cr	Mc	Ca	4,81	
	15	Cr	Mc	Ca	4,79	
ciclos $45 \pm 2^\circ\text{C}$ / $4 \pm -5^\circ\text{C}$	0	Cr	Mc	Ca	4,77	No hubo separación
	3	Cr	Mc	Ca	4,78	-
	6	Cr	Mc	Ca	4,99	
	9	Cr	Mc	Ca	5,04	
	12	Cr	Mc	Ca	5,16	
	15	Cr	Mc	Ca	5,20	

Leyenda: Cr: Crema, Mc: Marrón claro, Ca: Característico

Tabla 24. Valores FPS in vitro de la crema al 5% luego del proceso de estabilidad preliminar.

Λ (nm)	EE (λ) x I(λ)	FORMULACIONES		
		G1 (5%)	G2 (5%)	G3 (5%)
290	0,0150	0,0285	0,0292	0,0288
295	0,0817	0,0260	0,0261	0,0257
300	0,2874	0,0228	0,0226	0,0221
305	0,3278	0,0256	0,0294	0,0288
310	0,1864	0,0243	0,0267	0,0261
315	0,0839	0,0234	0,0233	0,0236
320	0,018	0,0213	0,0246	0,0215
FPS promedio		0,2437	0,2609	0,2556
SD		0,0047	0,0006	0,0002
FPS final		0,2428 \pm 0,0047	0,2609 \pm 0,0006	0,2556 \pm 0,0002

Donde:

G1: T = 45 \pm 2.

G2: T = -5 \pm 2.

G3: T = 24 horas a 45 \pm 2 °C y 24 horas a -5 \pm 2 °C – durante 15 días (6 ciclos).

V. DISCUSIÓN

En la extracción eficiente de metabolitos activos para el presente trabajo se utilizó etanol de 96° como solvente por el método de maceración, así mismo se hizo uso de un evaporador rotatorio para condensar el producto. Teniendo así un rendimiento de extracción de 2,35 % p/v. Estudios realizados con la pulpa de la fruta de *Vasconcellea pubescens* procedente de Chile, mostraron un rendimiento de 3,4 % p/v como extracción inicial, utilizando el método de maceración por una hora con metanol y filtración a presión reducida por debajo de los 50°C, liofilizándose la muestra representativa del extracto⁵. El método de concentración al vacío por evaporador rotario es ideal para las muestras que contengan en su concentración solventes volátiles a baja temperatura para evitar su degradación.

El resultado obtenido en este estudio en la cuantificación de polifenoles totales de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo por el método de Folin – Ciocalteu fue de 7,355 mg GAE/ g. En un estudio similar, en el que se trabajó con el fruto de *Vasconcellea pubescens*, obtuvieron un valor de 1,291 mg de GAE/ g evaluado por el método de HPLC¹³ mucho menor al nuestro; hay que mencionar que un limitante del método de FC es que otros compuestos puedan estar presentes en la muestra para donar electrones, lo cual provoca una sobreestimación de las propiedades reductoras y dificulta la comparación directa con diferentes tipos de compuestos fenólicos^{71,72}. El tamizaje fitoquímico del presente trabajo registró gran presencia de flavonoides con el ensayo de Shinoda, esto indicaría que dichos compuestos serían los principales representantes en el ensayo de polifenoles.

En identificación de compuestos polifenólicos para la especie *Vasconcellea pubescence*, perteneciente a la familia *Vasconcellea*, se identificó 19 compuestos fenólicos por HPLC con detección UV y ESI-MS-MS aislando los glucósidos de quercetina; rutin y manghaslin usando DPPH⁵. Así mismo Rutin es considerado un buen antioxidante debido a su capacidad para unir radicales libres e iones metálicos. Además, rutin es capaz de quelar iones de hierro (valencia II y III) los cuales pueden iniciar la formación de radicales libres de oxígeno⁷³, siendo la aglicona de la rutina la que ejerce un efecto protector al unirse a los radicales libres y desestabilizarlos⁴⁵. Diversos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles

totales^{75,76}; ya que cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente.

Normalmente, los métodos espectrofotométricos se emplean para realizar el análisis de polifenoles porque proporcionan una estimación del contenido total de polifenoles en la muestra o su capacidad antioxidante relativamente rápida, pero estos métodos no son específicos de polifenoles y se necesitan técnicas analíticas avanzadas. En general, los métodos para analizar los polifenoles deben ser simples, rápidos, ambientalmente sostenibles e integrales⁷⁷.

Se identificó también una alta presencia de triterpenoides para nuestro extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo por el ensayo de Lieberman-Buchardt debido a la presencia de una coloración rojo-naranja intenso con un anillo pardo. En un estudio en nuestro país relacionado a la familia, para *Vasconcellea candidans* se identificó también triterpenoides en la pulpa y cascara del fruto⁷⁸. Los efectos biológicos correspondientes de tales terpenoides son muy diversos y se pueden resumir de la siguiente manera: efectos antiinflamatorios, hepatoprotectores, analgésicos, antielastasa, antimicrobianos, antimicóticos, virostáticos, inmunomoduladores y tónicos⁷⁹.

Se realizó la determinación de actividad antioxidante total del extracto etanólico, por dos métodos *in vitro*, el primero fue según el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), los resultados de capacidad antioxidante fueron expresados como porcentaje de inhibición (IC50), el cual fue de 158,303 ug/mL y en comparación con el patrón Trolox, el valor TEAC fue de 13,6131 mg Trolox/g muestra, según el método ABTS^{•+} el IC50 fue de 88.2166 ug/mL y su valor TEAC fue 28,693 mg Trolox/g muestra. En un estudio en el que trabajaron con el fruto de *Vasconcellea pubescence*, evaluaron la actividad antioxidante, los resultados arrojaron para el método de DPPH 20.6mM TE/100 g FW que equivaldría a 81,22 mg Trolox/g muestra¹³, evidenciando que el extracto que trabajaron obtuvieron mayor cantidad de actividad antioxidante por el método DPPH, esto se debe a que el estudio en comparación cuantifico la actividad antioxidante por medio de HPLC, método moderno que tiene mejor rendimiento y mejor calidad que los métodos convencionales⁷⁷.

Debido a que las proteinasas tales como elastasas y colagenasas juegan un papel clave en la remodelación y mantenimiento de la integridad de la matriz extracelular,

los agentes capaces de inhibir estas proteinasas pueden tener efectos antienvjecimiento en órganos tales como la piel⁸⁰, en base a esto se realizaron las pruebas antielastasa y anticlagenasa usando como patrón a galato de epigallocatequina (EGCG) aislado del té verde *Camellia sinensis*, son inhibidores de la colagenasa y la elastasa, estos son poderosos bioflavonoides con una fuerte actividad antioxidante, en relación al porcentaje de inhibición de la enzima elastasa con galato de epigallocatequina (EGCG) y el extracto etanólico, mostró para la sustancia patrón EGCG un IC50 igual 918 ug/ml y para la muestra 1,3885 mg/ml. Y en relación al porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa de galato de epigallocatequina (EGCG) resultó en un valor de 12,1266 mg/ml, y para la muestra de *Vasconcellea weberbaueri* indicó un valor de 5,4118 mg/ml. Lo que revela una buena actividad antienzimática para estas enzimas comparándolo con los estándares.

En la actualidad, la investigación basada en compuestos antienvjecimiento especialmente de fuentes naturales, se está expandiendo enormemente. Los compuestos fitoquímicos, como los triterpenos, polifenoles y esteroides, se están investigando constantemente en cuanto a su potencial para proteger la piel de las radiaciones UV nocivas⁸⁰. En los métodos utilizados hasta el momento hemos identificado compuestos polifenólicos, así como triterpenoides que le podrían estar atribuyendo esta capacidad antienzimática expresada en los resultados. El importante papel de los inhibidores de elastasa en la formación de arrugas inducida por UV ha sido establecido por diversos estudios. En el estudio clínico realizado usando piel facial humana, se encontró que el extracto acuoso de *Zingiber officinale* (L.) Rose evitó la formación de arrugas en el área alrededor de las esquinas de los ojos⁸¹. En otro estudio, mucho más parecido al nuestro, en donde se trabajaron con extractos etanólicos de los frutos de *Phyllanthus emblica* L. (amla), *Silybum marianum* (silimarina) y *Manilkara zapota* (sapota) se exploraron su potencial antioxidante. Los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en amla, sapota y silimarina demostraron poseer propiedades antienvjecimiento potenciales, actividades anti elastasa y anticlagenasa (MMP1 y MMP2)⁸². Sin embargo, la actividad fue dependiente del solvente usado para la extracción. En ese caso el extracto de etanol mostró actividad más alta seguida de diclorometano y éter de petróleo. El extracto de vaina de cacao también ha sido investigado por su potencial como ingrediente cosmético debido a su antiarrugas, blanqueamiento de la piel y efectos de protección

solar. Esto ha sido atribuido a la presencia de ácido carboxílico, ácido fenólico, ácido graso, flavonoides, estilbenoides y terpenoides⁸³.

Las formulaciones al 1%, 3%, y 5% del extracto etanólico, se obtuvieron con éxito. Todas las formulaciones presentaron un aspecto visual y una textura adecuada para su aplicación tópica.

En los últimos años, las sustancias naturales se han incorporado cada vez más a formulaciones dermocosméticas; es una tendencia mundial para agregar valor a los productos, especialmente por el gran atractivo comercial y la mayor aceptación por parte de los clientes. Además, el desarrollo de formulaciones fotoprotectoras que utilizan filtros solares menos sintéticos es uno de los objetivos en la investigación de fotoprotección⁸⁵.

La fotodegradación de los protectores solares genera EROS que pueden dañar las estructuras cutáneas⁸⁶ y los extractos de planta con actividad antioxidante añadidos a la formulación podrían actuar capturando estas especies reactivas y aumentando la fotoestabilidad de los protectores solares^{87,88}.

Para la determinación del FPS por espectrofotometría ultravioleta se decidió realizar el método de Mansur; un método sencillo, económico y reproducible, que no involucra gran cantidad de reactivos ni se requiere un entrenamiento especial del operador del equipo, ya que es bastante fácil, por lo que puede ser aplicado en la industria cosmética y farmacéutica para conocer y mejorar las propiedades fotoprotectoras de extractos naturales, formulaciones en fase de desarrollo; así como, en productos intermedios y terminados⁸⁹.

Así, se realizaron diluciones de la crema a las concentraciones al 1, 3 y 5% en etanol absoluto con DMSO hasta obtener las concentraciones de 0,2 mg/mL. Las diluciones fueron sometidas a análisis espectrofotométrico en las longitudes de onda de 290, 295, 300, 305, 310, 315 y 320nm. Los valores obtenidos se utilizaron en la ecuación elaborada por Mansur. Nuestros resultados para la crema base, crema al 1, 3 y 5% fueron de $0,4428 \pm 0,0003$, $0,5565 \pm 0,0008$, $0,5892 \pm 0,0002$ respectivamente, los cuales indicaron un valor limitado para el método de FPS por Mansur, si comparamos el valor del FPS de extracto al 5% con el de la crema base vemos un ligero aumento atribuido al extracto. Sin embargo, hay muchos factores que afectan la determinación de los valores de FPS, como por ejemplo; el tipo de emulsión, los efectos e

interacciones de los componentes del vehículo, tales como ésteres, emolientes y emulsionantes utilizados en la formulación; la interacción del vehículo con la piel; la adición de otros ingredientes activos; el sistema de pH y las propiedades reológicas de la emulsión, entre otros factores, que pueden aumentar o disminuir la absorción de UV de cada protector solar⁹⁰. Se debe recordar también, que este método restringe la eficacia de las formulaciones elaboradas a los compuestos que absorben radiación sólo en el rango UVB, 290 a 320nm, no incluyendo así a todo el rango UV; es decir desde los 200 hasta los 400nm⁶⁹.

En base a esto, decidimos realizar una prueba de estabilidad preliminar con la crema al 5% para verificar si mantenía sus propiedades de origen y/o había disminuido su actividad fotoprotectora. Los resultados indicaron un mantenimiento de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas mas no en lo relacionado a la actividad fotoprotectora ya que el valor bajo hasta $0,2890 \pm 0,0002$, $0,2654 \pm 0,0008$, $0,2604 \pm 0,0008$ para las temperaturas a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 días, $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 días, 24 horas a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ y 24 horas a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ – durante 15 días (6 ciclos), lo que indicaría que se pueda estar inactivando la actividad del extracto etanólico y es necesario hacer uso de otras pre-formulaciones para el mantenimiento de esta.

VI. CONCLUSIONES

- 1) El contenido de polifenoles totales del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo fue de 7,355 mg GAE/g determinado por el método de Folin- Ciocalteau.
- 2) La actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico, por el método DPPH mostró un IC50 de 158,303 $\mu\text{g/mL}$ con un valor TEAC de 13,6131 mg Trolox/g y para el ABTS•+ su IC50 fue 98,5051 $\mu\text{g/mL}$ con un valor TEAC de 25,691 mg Trolox/g.
- 3) La actividad antienzimática *in vitro* del extracto etanólico, demostró para la actividad anticolagenasa un IC50 de 1,3885 mg/mL y actividad antielastasa con un IC50 de 5,4118 mg/mL.
- 4) La actividad fotoprotectora para las cremas al 1, 3 y 5% los valores de FPS fueron de $0,4428 \pm 0,0003$; $0,5565 \pm 0,0008$; $0,5892 \pm 0,0002$, respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la continuación del estudio para llevar a otro nivel la investigación, con equipos y materiales más específicos para la determinación exacta de los componentes del extracto.
2. Para futuras investigaciones, se recomienda realizar nuevos pilotos de cremas - base, en donde se ponga a prueba distintas formulaciones que puedan ayudar al desempeño del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo y sea más estable cuando se someta al estrés frío-calor.
3. Realizar estudios in vivo para ver las bondades de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo a nivel tisular.
4. Incentivar el desarrollo de formulaciones con extractos naturales que puedan presentar actividad fotoprotectora.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. D'Eeckenbrugge G, Drew R, Kyndt T, Scheldeman X. *Vasconcellea* for Papaya Improvement. In: Ming R, Moore P, ed. by. Genetics and Genomics of Papaya. 1st ed. Springer, New York; 2014. p. 48-51.
2. Jayavalli R, Balamohan T, Manivannan N, Govindaraj M. Breaking the intergeneric hybridization barrier in *Carica papaya* and *Vasconcellea cauliflora*. *Scientia Horticulturae*. 2011;130(4):787-94.
3. Van den Eynden V, Cueva E, Cabrera O. Wild Foods from Southern Ecuador. *Economic Botany*. 2003;57(4):576-603.
4. Briones-Labarca V, Plaza-Morales M, Giovagnoli-Vicuña C, Jamett F. High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;60(1):525-34.
5. Simirgiotis M, Caligari P, Schmeda-Hirschmann G. Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2009;115(2):775-784.
6. Afaq F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011;508(2):144-151.
7. Duque L, Bravo K, Osorio E. A holistic anti-aging approach applied in selected cultivated medicinal plants: A view of photoprotection of the skin by different mechanisms. *Industrial Crops and Products*. 2017;1(1):431-439
8. Mukherjee P, Bahadur S, Chaudhardy S, Harwansh R, Nema N. Validation of Medicinal Herbs for Skin Aging. In: Mukherjee P, ed. by. Evidence-Based Validation of Herbal Medicin. 1st ed. 2015. p. 119-147.
9. Ocampo J, d'Eeckenbrugge G, Scheldeman X. Diversidad, distribución y cambio climático en la familia Caricaceae en Colombia. Lecture presented at; 2013; VII Congreso Colombiano de Botánica, Tolima-COLOMBIA.
10. León B. Caricaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología*. 2006;13(2):245.

11. Torres E, Vásquez E. Caracterización del fruto maushan (*Vasconcellea weberbaueri* Harms V.M.Badillo) como materia prima para la elaboración de mermelada. *Investigaciones Amazonenses*. 2010;3(1):12-15.
12. Culquimboz Y, Salazar S, Millones C, Torres E, Vásquez E. Extracción de pectina mediante el método de hidrólisis ácida en frutos de maushan (*Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo) provenientes del distrito de San Miguel de Soloco, región Amazonas. *Aporte Santiaguino*. 2010; 3(2): 177-184.
13. Uribe E, Delgadillo A, Giovagnoli-Vicuña C, Quispe-Fuentes I, Zura-Bravo L. Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*. 2015;1(1):1-8.
14. Mishra A, Mishra A, Chattopadhyay P. Herbal Cosmeceuticals for Photoprotection from Ultraviolet B Radiation: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2011;10(3):351-360.
15. Leiva González S, Zapata Cruz M, Gayoso Bazán G, Chang Chávez L. Frutas silvestres con potencial vitamínico de los Andes Centrales de América. *Arnaldoa*. 2013;20(2):315-358.
16. Scheldeman X, Kynt T, d'Eeckenbrugge G, Ming R, Drew R, Van Droogenbroeck B y col. *Vasconcellea*. In: Kole C, ed. by. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. 1st ed. Springer, Berlin; 2011. p. 214-229.
17. INEI: Geografía y territorio. Calificación de creación y ubicación geográfica de la capital legal de los distritos según provincia y distrito: 2000 [Internet]. n.d. [consultado el 08 de julio del 2018]. Disponible en: <http://proyectos.inei.gob.pe/web/biblioineipub/bancopub/Est/Lib0432/cap01.htm>.
18. Scheldeman X, Willems L, Coppens d'Eeckenbrugge G, Romeijn-Peeters E, Restrepo MT, Romero Motoche J, y col. Distribution, diversity and environmental adaptation of Highland papaya (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical. *Plant Conservation and Biodiversity*. 2007;16(6):293–310.
19. Gleichenhagen M, Schieber A. Current challenges in polyphenol analytical chemistry. *Current Opinion in Food Science*. 2016;7(1):43-49.

20. Andres La Cueva C, Medina Remon A, Llorach R, Urpi Sarda M. Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. In: de la Rosa L, Alvarez Parrilla E, Gonzales Aguilar G, ed. by. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability. 1st ed. 2009. p. 53-88.
21. Weng C, Yen G. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(1):76-87.
22. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;79(5):727-47.
23. Kumar Y, Bhatia A. Chapter 49 - Polyphenols and Skin Cancers. In: Ross Watson R, Preedy V, Zibadi S, ed. by. Polyphenols in Human Health and Disease. 1st ed. 2014. p. 643-651.
24. Afaq F, K. Katiyar S. Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011;11(14):1200-15.
25. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52(4):673-751.
26. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81(1):268-76.
27. Vayalil P, Mittal A, Hara Y, Elmets C, Katiyar S. Green Tea Polyphenols Prevent Ultraviolet Light-Induced Oxidative Damage and Matrix Metalloproteinases Expression in Mouse Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004;122(6):1480-7.
28. Vayalil P, Elmets C, Katiyar S. RETRACTED: Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*. 2003;24(5):927-36.
29. Mayor R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*. 2010;5(2):23-29

30. Rodwell V, Bender D, Botham K. Harper. *Bioquímica ilustrada*. 30th ed. Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 2016.pp 482-487.
31. Hirao T. Structure and Function of Skin From a Cosmetic Aspect. In: Sakamoto K, Lochhead R, Yamashita Y, Maibach H, ed. by. *Cosmetic Science and Technology*. 1st ed. 2017. p. 673-83.
32. Bergfeld WF. The aging skin. *International Journal of Fertility Womens Medicine*. 1997;42(2): 57-66.
33. Robinson M. Population differences in skin structure and physiology and the susceptibility to irritant and allergic contact dermatitis: implications for skin safety testing and risk assessment. *Contact Dermatitis*. 1999; 41(2): 65-79.
34. Südel K, Venzke K, Mielke H y col. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochemistry and Photobiology*. 2005;81(3): 581-7.
35. Elias P. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Experimental Dermatology*. 1996;5(4):191-201.
36. Brincat M. Oestrogens and the skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2004;3(1):41-9.
37. McCallion R, Li Wan Po A. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 1993;18(1):15-32.
38. Farage M, Miller K, Elsner P, Maibach H. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008;30(2):87-95.
39. Fierro L, Campos N, Contreras J, Espinosa S, López I, Márquez R, Ramírez M, Veras E, Rodríguez A. Productos enzimáticos (hialuronidasa, colagenasa y lipasa) y su uso en Dermatología. *Dermatología Revista Mexicana*. 2017;61(3):206-219.
40. Philips N, Siomyk H, Bynum D. Skin Cancer, Polyphenols, and Oxidative Stress. In: Preedy V, ed by. *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. 1st ed. Academic Press. New York; 2014. p. 48-51.
41. Brash D, Ziegler A, Jonason A, Simon J, Kunala S, Leffell D. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc*.1996; 1(2);136–142.

42. Afaq F, Mukhtar H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*. 2006;15(9):678–84.
43. Halliday G, Lyons J. Inflammatory Doses of UV May Not Be Necessary for Skin Carcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 2008;84(2):272-283.
44. Katiyar S, Bergamo B, Vyalil P, Elmetts C. Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001;65(2-3):109-114.
45. Svobodova A, Psotova J, Walterova D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers*. 2003;147(2):137-145.
46. Wondrak G, Jacobson M, Jacobson E. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5(2):215-237.
47. Ichihashi M, Ando H, Yoshida M, Niki Y, Matsui M. Photoaging of the skin. *ANTI-AGING MEDICINE*. 2009;6(6):46-59.
48. Krutmann J. The role of UV rays in skin aging. *Eur J Dermatol*. 2001;11(2): 170–171.
49. Afaq F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011;508(2):144-51.
50. Bickers D, Athar M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(12):2565-75.
51. Tyan Y, Liao J, Klauser R, Wu I, Weng C. Assessment and characterization of degradation effect for the varied degrees of ultra-violet radiation onto the collagen-bonded polypropylene non-woven fabric surfaces. *Biomaterials*. 2002;23(1):65-76.
52. Mohamed F, Bradley D, Winlove C. Effects of ionizing radiation on extracellular matrix. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 2007;580(1):566-569.
53. Rabotyagova O, Cebe P, Kaplan D. Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation. *Materials Science and Engineering: C*. 2008;28(8):1420-1429.
54. Seite S, Colige A, Piquemal-Vivenot P, Montastier C, Fourtanier A, Lapiere C y col. A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against

biological changes occurring in photoaging. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 2000;16(4):147-155.

55. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel M, Trost A, Richter K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules*. 2015;5(2):545-589.
56. Imokawa G. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase. *Archives of Dermatological Research*. 2007;300(S1):7-20.
57. Leroy D. Les crèmes solaires. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 2007; 126(1): 357-62.
58. DeBuys H, Levy S, Murray J, Madey D, Pinnell S. Modern Approaches To Photoprotection. *Dermatologic Clinics*. 2000;18(4):577-590.
59. Murphy GM. Sunblocks: Mechanisms of action. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1999;15(1):34–36
60. Georgalas A, Kasprzyk E. Substantiation of broad spectrum & UVA radiation attenuation claims for titanium dioxide. *Journal of Cosmetic Science* 2002; 53(3): 313-314.
61. Kollias N. The Absorption Properties of "Physical" Sunscreens. *Archives of Dermatology*. 1999;135(2):209-210.
62. Dreher F, Maibach H. Protective effects of topical antioxidants in humans. *Current Problems in Dermatology*. 2001;29(1):157-164.
63. Gilaberte Y, Coscojuela C, Sáenz de Santamaría M, González S. Fotoprotección. *Actas. Dermosifiliográficas*. 2003;94(5):271-93.
64. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos. Brasilia: Gerencia General de Cosméticos; 2005 p. 16-40.
65. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 2 Ed. Lima-Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
66. ISO 14502-1. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. International Organization for Standardization. 2005.
67. Suárez S. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum* var. hualarino

- (ajo) en modelos in vitro. [Tesis de doctorado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2014.
68. Thring T, Hili P, Naughton D. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009; 9(1):27-37.
 69. The United States pharmacopeia 40. 40th ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2017.
 70. Mansur J, Brender M, Azulay R. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *An Bras Dermatol*. 1986; 61(2):167-172.
 71. Aleixandre-Tudo J, Buica A, Nieuwoudt H, Aleixandre J, du Toit W. Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(20):4009-4026.
 72. Everette J, Bryant Q, Green A, Abbey Y, Wangila G, Walker R. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(14):8139-8144.
 73. Valério D, Georgetti S, Magro D, Casagrande R, Cunha T, Vicentini F y col. Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. *Journal of Natural Products*. 2009;72(11):1975-1979.
 74. Kappus R, Curry C, McAnulty S, Welsh J, Morris D, Nieman D y col. The Effects of a Multiflavonoid Supplement on Vascular and Hemodynamic Parameters following Acute Exercise. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011;2011(1):1-7.
 75. Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Natural Products Communications*. 2013;8(12): 1821–1829.
 76. Capriotti A, Cavaliere C, Foglia P, Piovesana S, Ventura S. Chromatographic Methods Coupled to Mass Spectrometry Detection for the Determination of Phenolic Acids in Plants and Fruits. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2014;38(3):353-370.
 77. Sanna R, Piras C, Marincola F, Lecca V, Maurichi S, Scano P. Multivariate Statistical Analysis of the UV-Vis Profiles of Wine Polyphenolic Extracts during Vinification. *Journal of Agricultural Science*. 2014;6(12):152-162.

78. Armas E. Evaluación fitoquímica – bromatológico de *Vascoencellea candicans* como recurso promisorio, Contumanza, Cajamarca – Peru. [Tesis de Titulación para obtener el grado de bióloga]. Peru:Universidad Nacional de Trujillo. 2014
79. Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D y col. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*. 2006;23(3):394.
80. Thring T, Hili P, Naughton D. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med*. 2009; 9(1): 27.
81. Imokawa G. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase. *Archives of Dermatological Research*. 2007;300(S1):7-20.
82. Pientaweeratch S, Panapisal V, Tansirikongkol A. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharmaceutical Biology*. 2016;54(9):1865-1872.
83. Abdul Karim A, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Abd Gani S, Zainudin B y col. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;14(1):381-394.
84. Huang S, Frankel E, German J. Antioxidant activity of .alpha.- and .gamma.-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994;42(10):2108-2114.
85. Barradas T, de Campos V, Senna J, Coutinho C, Tebaldi B, Silva K y col. Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015;480(1):214-221.
86. Reis Mansur M, Leitão S, Cerqueira-Coutinho C, Vermelho A, Silva R, Presgrave O y col. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016;26(2):251-258.
87. Jarzycka A, Lewińska A, Gancarz R, Wilk K. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in

- photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013;128(1):50-57.
88. Cerqueira-Coutinho C, Santos-Oliveira R, dos Santos E, Mansur C. Development of a photoprotective and antioxidant nanoemulsion containing chitosan as an agent for improving skin retention. *Engineering in Life Sciences*. 2015;15(6):593-604.
89. De Gálvez M. Antioxidants in Photoprotection: Do They Really Work?. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*. 2010;101(3):197-200.
90. Agrapidis-Paloympis L. E, Nash R, Shaath N. The effect of solvents on the ultraviolet absorbance of sunscreens. *Journal of Society Cosmetic Chemists*. New York. 1987; 38(1): 209-221.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Clasificación taxonómica.



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 14-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama fértil y frutos inmaduros) recibida de la egresada **Jackeline ESCUDERO RODAS**, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V. M. Badillo**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: DILLENIIDAE

ORDEN: VIOLALES

FAMILIA: CARICACEAE

GENERO: *Vasconcellea*

ESPECIE: *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V. M. Badillo
Sinónimo-Nomenclatural: *Carica weberbaueri* Harms

Nombre vulgar: "Maushan, papaya de huerta"
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere conveniente.

Lima, 18 de enero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/yhr.

Figura 19. Constancia de identificación botánica por el Museo de Historia Natural

ANEXO 2. Procedimiento de fabricación de la crema elaborada a base del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

DESCRIPCIÓN DE LA OPERACIÓN	CANTIDAD (g)
1. Dispensación. 1.1. Se pesa utilizando una balanza analítica Marca OHAUS. - Crema base - Propilenglicol - Extracto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo
2. Mezcla de propilenglicol con el extracto (M1). 2.1. Se somete a temperatura en baño maría marca Memmert a 37°C con constante agitación. 2.2. Adicionar - Extracto de <i>Vasconcellea weberbaueri</i> (Harms) V.M. Badillo Y mezclar hasta una completa incorporación.
3. Incorporación de M1 con la crema base 3.1. Se somete a temperatura en baño maría marca Memmert a 37°C con constante agitación: - Crema base - Mezcla de M1 Hasta una completa incorporación.

ANEXO 3. Ejecución del proyecto.



Figura 20. Elaboración del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms)
V.M. Badillo.



Agua Metanol Etanol n-butanol 1,2-diclorometano Éter etílico

Figura 21. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.



Figura 22. Preparación de las pruebas enzimáticas.

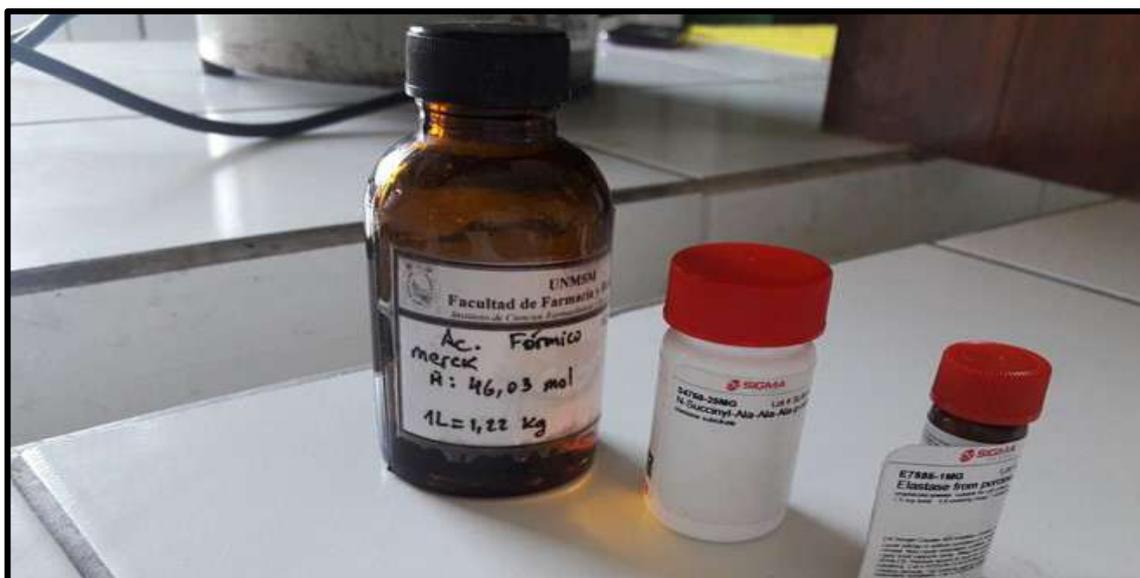


Figura 23. Reactivos a usar en las pruebas enzimáticas.



Figura 24. Crema dermatocósmica elaborada a base del fruto de *Vasconcella weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo al 1%.



Figura 25. Crema dermocosmética elaborada a base del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo al 3%.



Figura 26. Crema dermocosmética elaborada a base del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo al 5%.

ANEXO 4. Valoración estadística.

Tabla 25. Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método **DPPH** del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

ANOVA					
Absorbancias					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,128	4	,032	79,264	,000
Dentro de grupos	,004	10	,000		
Total	,132	14			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancias , HSD Tukey						
(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/ml	16.67 ug/ml	.053633	.016391	,051	-.00031	.10758
	50 ug/ml	.092133*	.016391	,002	.03819	.14608
	116,67 ug/ml	.193800*	.016391	,000	.13986	.24774
	183,33 ug/ml	.252567*	.016391	,000	.19862	.30651
16.67 ug/ml	0 ug/ml	-.053633	.016391	,051	-.10758	.00031
	50 ug/ml	.038500	.016391	,207	-.01544	.09244
	116,67 ug/ml	.140167*	.016391	,000	.08622	.19411
	183,33 ug/ml	.198933*	.016391	,000	.14499	.25288
50 ug/ml	0 ug/ml	-.092133*	.016391	,002	-.14608	-.03819
	16.67 ug/ml	-.038500	.016391	,207	-.09244	.01544
	116,67 ug/ml	.101667*	.016391	,001	.04772	.15561
	183,33 ug/ml	.160433*	.016391	,000	.10649	.21438
116,67 ug/ml	0 ug/ml	-.193800*	.016391	,000	-.24774	-.13986
	16.67 ug/ml	-.140167*	.016391	,000	-.19411	-.08622
	50 ug/ml	-.101667*	.016391	,001	-.15561	-.04772
	183,33 ug/ml	.058767*	.016391	,032	.00482	.11271
183,33 ug/ml	0 ug/ml	-.252567*	.016391	,000	-.30651	-.19862
	16.67 ug/ml	-.198933*	.016391	,000	-.25288	-.14499
	50 ug/ml	-.160433*	.016391	,000	-.21438	-.10649
	116,67 ug/ml	-.058767*	.016391	,032	-.11271	-.00482

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla 26. Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método **ABTS^{••}** del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

ANOVA					
Absorbancias					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,517	4	,129	773,915	,000
Dentro de grupos	,002	10	,000		
Total	,519	14			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancias						
HSD Tukey						
(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 ug/ml	40 ug/ml	.113333*	.010554	,000	.07860	.14807
	80 ug/ml	.286433*	.010554	,000	.25170	.32117
	120 ug/ml	.411133*	.010554	,000	.37640	.44587
	160 ug/ml	.504533*	.010554	,000	.46980	.53927
40 ug/ml	0 ug/ml	-.113333*	.010554	,000	-.14807	-.07860
	80 ug/ml	.173100*	.010554	,000	.13837	.20783
	120 ug/ml	.297800*	.010554	,000	.26307	.33253
	160 ug/ml	.391200*	.010554	,000	.35647	.42593
80 ug/ml	0 ug/ml	-.286433*	.010554	,000	-.32117	-.25170
	40 ug/ml	-.173100*	.010554	,000	-.20783	-.13837
	120 ug/ml	.124700*	.010554	,000	.08997	.15943
	160 ug/ml	.218100*	.010554	,000	.18337	.25283
120 ug/ml	0 ug/ml	-.411133*	.010554	,000	-.44587	-.37640
	40 ug/ml	-.297800*	.010554	,000	-.33253	-.26307
	80 ug/ml	-.124700*	.010554	,000	-.15943	-.08997
	160 ug/ml	.093400*	.010554	,000	.05867	.12813
160 ug/ml	0 ug/ml	-.504533*	.010554	,000	-.53927	-.46980
	40 ug/ml	-.391200*	.010554	,000	-.42593	-.35647
	80 ug/ml	-.218100*	.010554	,000	-.25283	-.18337
	120 ug/ml	-.093400*	.010554	,000	-.12813	-.05867

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla 27. Análisis estadístico de la actividad anticlagenasa del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

ANOVA					
Absorbancias					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,262	3	,087	47374,084	,000
Dentro de grupos	,000	8	,000		
Total	,262	11			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancias						
HSD Tukey						
(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 mg/ml	0.5 mg/ml	.095233*	.001108	,000	.09168	.09878
	1 mg/ml	.236433*	.001108	,000	.23288	.23998
	1.5 mg/ml	.390900*	.001108	,000	.38735	.39445
0.5 mg/ml	0 mg/ml	-.095233*	.001108	,000	-.09878	-.09168
	1 mg/ml	.141200*	.001108	,000	.13765	.14475
	1.5 mg/ml	.295667*	.001108	,000	.29212	.29922
1 mg/ml	0 mg/ml	-.236433*	.001108	,000	-.23998	-.23288
	0.5 mg/ml	-.141200*	.001108	,000	-.14475	-.13765
	1.5 mg/ml	.154467*	.001108	,000	.15092	.15802
1.5 mg/ml	0 mg/ml	-.390900*	.001108	,000	-.39445	-.38735
	0.5 mg/ml	-.295667*	.001108	,000	-.29922	-.29212
	1 mg/ml	-.154467*	.001108	,000	-.15802	-.15092

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla 28. Análisis estadístico de la actividad antielastasa del extracto etanólico del fruto de *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo.

ANOVA					
Absorbancias					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,122	3	,041	16277,033	,000
Dentro de grupos	,000	8	,000		
Total	,122	11			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancias						
HSD Tukey						
(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0 mg/ml	2 mg/ml	.014200*	.001289	,000	.01007	.01833
	4 mg/ml	-.049067*	.001289	,000	-.05320	-.04494
	6 mg/ml	.214633*	.001289	,000	.21050	.21876
2 mg/ml	0 mg/ml	-.014200*	.001289	,000	-.01833	-.01007
	4 mg/ml	-.063267*	.001289	,000	-.06740	-.05914
	6 mg/ml	.200433*	.001289	,000	.19630	.20456
4 mg/ml	0 mg/ml	.049067*	.001289	,000	.04494	.05320
	2 mg/ml	.063267*	.001289	,000	.05914	.06740
	6 mg/ml	.263700*	.001289	,000	.25957	.26783
6 mg/ml	0 mg/ml	-.214633*	.001289	,000	-.21876	-.21050
	2 mg/ml	-.200433*	.001289	,000	-.20456	-.19630
	4 mg/ml	-.263700*	.001289	,000	-.26783	-.25957

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.