

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Polifenoles, actividades antioxidante, antielastasa,  
anticolagenasa, efecto fotoprotector de *Lessonia  
nigrescens* Bory y desarrollo de una forma  
dermocosmética**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Gianina Liliana Giurfa Tutaya  
Jean Pierre Oblitas Barboza

**ASESOR**

Américo Jorge Castro Luna

Lima - Perú

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

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

**“Polifenoles, actividades antioxidante, antielastasa, anticologenasa, efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollo de una forma desmocosmética”**

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**GIANINA LILIANA GIURFA TUTAYA Y  
JEAN PIERRE OBLITAS BARBOZA**

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:

*Sobresaliente (A)* Dieciocho

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, 06 de febrero de 2017.

FACULTAD

Mg. César Máximo Fuertes Ruitón  
Presidente

Mg. Luis Alberto Rojas Ríos  
Miembro

Q.F. Carmen Gladys Peña Suasnabar  
Miembro

Q.F. Omar Hugo Santa María Chávez  
Miembro

**“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”**

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú  
Telfs.: (511) 328-4737 / 328-4739 Fax: (511) 619-7000 anexo 4819 Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR233265



## **DEDICATORIA**

A mis padres Gianina y Roberto por su esfuerzo y dedicación en brindarme lo mejor, por su apoyo incondicional en cada una de las metas trazadas y por ser ejemplo de los valores que guían mi vida.

A mi hermana Adriana por su apoyo y comprensión durante estos últimos años.

**Gianina Liliana Giurfa Tutaya**

Este logro lo dedico a mi familia por el apoyo incondicional brindado durante toda mi vida académica.

Asimismo, dedico este logro a mi querida abuela María Delfina Palacios, Dios la tenga en su santa gloria. Ella motivó mi deseo de aprender y ayudar a los demás siempre con una sonrisa.

**Jean Pierre Oblitas Barboza**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Américo Castro Luna, nuestro maestro, asesor y amigo por su orientación constante en el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. Silvia Suárez Cunza por sus enseñanzas y contribución en este importante proceso.

## ÍNDICE

Índice de tablas	
Índice de figuras	
Resumen	
Summary	
I. Introducción	1
II. Objetivos	3
2.1 Objetivo general	3
2.1 Objetivos específicos	3
III. Marco teórico	4
3.1 Aspectos botánicos	4
3.1.1 Clasificación taxonómica	4
3.1.2 Descripción morfológica	4
3.1.3 Distribución geográfica y hábitat	5
3.1.4 Uso tradicional	5
3.2 Compuestos polifenólicos	6
3.2.1 Origen y estructura de los compuestos polifenólicos	6
3.2.2 Actividad biológica de los polifenoles	7
3.3 Actividad antioxidante	8
3.3.1 Estrés oxidativo/nitrosativo	8
3.3.2 Radicales libres	9
3.3.3 Peroxidación lipídica	10
3.3.4 Peroxidación lipídica y envejecimiento	14
3.3.5 Sistema antioxidante	14
3.3.6 Sustancias antioxidantes	15
3.3.6.1 Antioxidantes enzimáticos	15
3.3.6.2 Antioxidantes no enzimáticos	16
3.4 Piel y envejecimiento	19
3.4.1 Estructura de la piel	19
3.4.2 Envejecimiento cutáneo	21

3.4.3 Fotoenvejecimiento	23
3.5 Fotoprotección	24
3.5.1 Barreras físicas	24
3.5.2 Protectores solares	25
IV. Parte experimental	28
4.1 Materiales y métodos	28
4.1.1 Materiales	28
4.1.2 Reactivos	28
4.1.3 Equipos	28
4.2 Preparación de la muestra	29
4.2.1 Colecta de material biológico	29
4.2.2 Clasificación taxonómica	29
4.2.3 Tratamiento de la muestra	29
4.2.4 Preparación del extracto	29
4.3 Marcha fitoquímica	30
4.4 Determinación de polifenoles totales. Método de Folin – Ciocalteu	30
4.4.1 Fundamento	30
4.4.2 Procedimiento	30
4.5 Determinación de la actividad antioxidante	31
4.5.1 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	31
4.5.1.1 Fundamento	31
4.5.1.2 Procedimiento	32
4.5.2 Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico (ABTS <sup>•+</sup> )	33
4.5.2.1 Fundamento	33
4.5.2.2 Procedimiento	33
4.6 Determinación de la actividad antielastasa	35
4.6.1 Fundamento	35
4.6.2 Procedimiento	35
4.7 Determinación de la actividad anticlagenasa	36
4.5.1 Fundamento	36
4.5.2 Procedimiento	36
4.8 Diseño de la forma dermocosmética	37
4.9 Determinación del efecto fotoprotector	37

4.9.1 Materiales	37
4.9.2 Diseño experimental	38
4.9.3 Procedimiento	38
V. Resultados	40
5.1 Extracción y rendimiento	40
5.2 Marcha fitoquímica	40
5.3 Determinación de polifenoles totales. Método de Folin – Ciocalteu	41
5.4 Determinación de la actividad antioxidante	42
5.4.1 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	42
5.4.2 Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico (ABTS <sup>•+</sup> )	45
5.5 Determinación de la actividad antielastasa	48
5.6 Determinación de la actividad anticolagenasa	49
5.7 Diseño de la forma dermocosmética	51
5.8 Determinación del efecto fotoprotector	51
VI. Discusión	53
VII. Conclusiones	58
VIII. Recomendaciones	59
IX. Referencias bibliográficas	60
X. Anexos	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Preparación de tubos de reacción para la determinación de polifenoles totales.	31
Tabla 2.	Preparación de tubos de reacción para el método de captación de DPPH.	32
Tabla 3.	Preparación de tubos de reacción para el método de captación de ABTS <sup>•+</sup> .	34
Tabla 4.	Formulación de la crema.	37
Tabla 5.	Distribución de las muestras para la evaluación del efecto fotoprotector.	38
Tabla 6.	Porcentaje de rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de estípite, fronda y rizoide.	40
Tabla 7.	Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Lessonia nigrescens</i> Bory.	40
Tabla 8.	Contenido de polifenoles totales (CPT) en los extractos de estípite, fronda y rizoide.	41
Tabla 9.	Porcentaje de inhibición de DPPH del estándar Trolox <sup>®</sup> .	42
Tabla 10.	Porcentaje de inhibición de DPPH de los extractos hidroalcohólicos de estípite, fronda y rizoide.	44
Tabla 11.	Porcentaje de inhibición de ABTS <sup>•+</sup> del estándar Trolox <sup>®</sup> .	45
Tabla 12.	Porcentaje de inhibición de ABTS <sup>•+</sup> de los extractos hidroalcohólicos de estípite, fronda y rizoide.	47
Tabla 13.	Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del estándar galato de epigallocatequina (EGCG) y del extracto hidroalcohólico de rizoide.	49
Tabla 14.	Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del estándar galato de epigallocatequina (EGCG) y del extracto hidroalcohólico de rizoide.	50
Tabla 15	Descripción del análisis histopatológico para determinación del efecto fotoprotector.	52



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Biosíntesis de compuestos fenólicos.	7
Figura 2.	Paso de iniciación del proceso de peroxidación lipídica.	12
Figura 3.	Fase inicial del paso de propagación del proceso de peroxidación lipídica indicando el consumo de oxígeno.	13
Figura 4.	Curva de calibración del ácido gálico (estándar).	41
Figura 5.	Curva de captación de DPPH del estándar Trolox®.	42
Figura 6.	Curva de captación de DPPH del extracto hidroalcohólico de estípite.	43
Figura 7.	Curva de captación de DPPH del extracto hidroalcohólico de fronda.	43
Figura 8.	Curva de captación de DPPH del extracto hidroalcohólico de rizoide.	44
Figura 9.	Curva de captación de ABTS <sup>•+</sup> del estándar Trolox®.	45
Figura 10.	Curva de captación de ABTS <sup>•+</sup> del extracto hidroalcohólico de estípite.	46
Figura 11.	Curva de captación de ABTS <sup>•+</sup> del extracto hidroalcohólico de fronda	46
Figura 12.	Curva de captación de ABTS <sup>•+</sup> del extracto hidroalcohólico de rizoide.	47
Figura 13.	Curva de inhibición de elastasa del estándar galato de epigallocatequina (EGCG).	48
Figura 14.	Curva de inhibición de elastasa del extracto hidroalcohólico de rizoide.	48
Figura 15.	Curva de inhibición de colagenasa del estándar galato de epigallocatequina (EGCG).	49
Figura 16.	Curva de inhibición de colagenasa del extracto hidroalcohólico de rizoide.	50

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue investigar la presencia de polifenoles, las actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y el efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollar una forma dermocosmética. El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se determinó por neutralización de los radicales 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>). La actividad antielastasa y anticolagenasa se evaluó por inhibición de las enzimas elastasa y colagenasa. El efecto fotoprotector se evaluó *in vivo* en 30 ratones albinos adultos machos de la especie *Mus musculus* Cepa Bald C<sub>53</sub> que fueron distribuidos en seis grupos. Con el extracto hidroalcohólico de rizoide se diseñó y elaboró cremas al 1; 3 y 5 % que se aplicaron sobre la piel de los ratones en el tercio anterior dorsal del lomo, para luego ser irradiados con luz UV-B. El extracto de rizoide presentó mayor concentración de polifenoles (0,629 mg de equivalentes de ácido gálico/g alga seca). En la evaluación de la actividad antioxidante el extracto del rizoide presentó mayor porcentaje de inhibición por los métodos DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, (IC<sub>50</sub> = 11 mg/mL e IC<sub>50</sub> = 90,9 mg/mL) frente al estándar Trolox® (IC<sub>50</sub> = 5,6x10<sup>-3</sup> mg/mL e IC<sub>50</sub> = 154,33x10<sup>-3</sup> mg/mL). En la determinación de la actividad antienzimática *in vitro*, el extracto hidroalcohólico de rizoide presentó bajo potencial de inhibición de las enzimas elastasa y colagenasa; siendo IC<sub>50</sub> = 6,2 mg/mL e IC<sub>50</sub> = 50,1 mg/mL respectivamente, ante el control positivo galato de epigallocatequina (EGCG) (IC<sub>50</sub> = 13,4x10<sup>-3</sup> mg/mL e IC<sub>50</sub> = 1,35 mg/mL respectivamente). El efecto fotoprotector se evidenció en el análisis macroscópico e histopatológico de la piel, observándose diferencias favorables en el extracto hidroalcohólico del rizoide frente a una crema comercial FPS 50. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Lessonia nigrescens* Bory, presenta polifenoles, actividad antioxidante *in vitro*, actividad fotoprotectora *in vivo* y bajo potencial de actividad antielastasa y anticolagenasa *in vitro*.

**Palabras clave:** *Lessonia nigrescens* Bory, polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa, fotoprotección.

## SUMMARY

The aim of this study was to research the presence of polyphenols, the antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase activities, the photoprotective effect of *Lessonia nigrescens* Bory and to develop of a dermocosmetic product. The total content of polyphenols was determined through the method of Folin-Ciocalteu. The antioxidant activity was determined by neutralizing of the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) and the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS<sup>•+</sup>). The anti-elastase and anti-collagenase activities were determined by inhibition of the elastase and collagenase enzymes. The photoprotective effect was evaluated *in vivo* in 30 adult male albino mice from the specie *Mus musculus* Bald C<sub>53</sub> which were distributed into six groups. Creams at 1, 3 and 5 % were developed and prepared with the hydroalcoholic extract of holdfast which were applied over the skin of mice in the anterior third of the back. Then, they were irradiated with UV-B light. The highest concentration of polyphenols was found in the holdfast extract (0,629 mg gallic acid equivalent/g of extract). In the evaluation of the antioxidant activity the holdfast extract showed the highest inhibition percentage by DPPH and ABTS<sup>•+</sup> methods (IC<sub>50</sub> = 11 mg/mL and IC<sub>50</sub> = 90,9 mg/mL) than Trolox® standard (IC<sub>50</sub> = 5,6x10<sup>-3</sup> mg/mL and IC<sub>50</sub> = 154,33x10<sup>-3</sup> mg/mL). In the *in vitro* determination of anti-enzymatic activity, the hydroalcoholic extract of holdfast showed low inhibition potential over the enzymes elastase and collagenase ; respectively, IC<sub>50</sub> = 6,2 mg/mL and IC<sub>50</sub> = 50,1 mg/mL, against the positive control epigallocatechin gallate (EGCG) (IC<sub>50</sub> = 13,4x10<sup>-3</sup> mg/mL and IC<sub>50</sub> = 1,35 mg/mL respectively). The photoprotective effect was shown in the microscopic and histopathologic analysis which showed favorable differences between the hydroalcoholic extract of holdfast against the commercial cream FPS 50. We conclude that the hydroalcoholic extract of *Lessonia nigrescens* Bory, presents polyphenols, antioxidant activity *in vitro*, photoprotective activity *in vivo* and low potential anti-elastase and anti-collagenase activities *in vitro*.

**Keywords:** *Lessonia nigrescens* Bory, polyphenols, antioxidant activity, anti-elastase, anti-collagenase, photoprotection.

## I. INTRODUCCIÓN

Como organismos fotosintéticos, las algas marinas están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, que permiten la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes<sup>1</sup>. La ausencia de daños oxidativos en sus componentes estructurales y fisiológicos sugiere que estos organismos presentan un eficiente sistema de defensas antioxidantes<sup>2</sup>. Existen pocos antecedentes sobre el estudio de actividad antioxidante y fotoprotectora de las macro algas phaeofytas; sin embargo, el interés por las algas pardas ha ido en aumento debido a que poseen una variedad de metabolitos secundarios tales como los polifenoles. Estos compuestos son un conjunto heterogéneo de moléculas que se caracterizan por poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas<sup>3</sup>. Diversos estudios acerca de los polifenoles sugieren que estos podrían tener actividades antioxidante, antienvjecimiento, antiinflamatoria, entre otras<sup>4-9</sup>.

Debido al incremento de los niveles de radiación ultravioleta en la superficie terrestre las personas nos encontramos más propensas a sufrir enfermedades dermatológicas como las quemaduras solares y el cáncer de piel. La sobreexposición a la radiación solar contribuye a la formación en exceso de radicales libres. El estrés oxidativo es definido como la producción creciente de especies reactivas de oxígeno (EROS) en cantidades que exceden las defensas antioxidantes celulares. Como consecuencia de ello se producen daños a los lípidos, proteínas y ADN, involucrados en el desarrollo de diversas patologías<sup>2,10</sup>.

La fotoprotección tiene como objeto prevenir el daño que ocurre en la piel como resultado de su exposición a la radiación ultravioleta. La formación de EROS acelera el proceso de envejecimiento de la piel desorganizando las fibras colágenas y elásticas, los fibroblastos, las células inmunes cutáneas y la microvasculatura del estrato epidérmico<sup>11</sup>.

Existen investigaciones acerca de las propiedades de algunas algas como agentes antioxidantes. Por ejemplo, en el estudio del alga parda *Sargassum muticum* se demostró por el método de Folin-Ciocalteu que es un alga rica en polifenoles y, además se determinó su actividad antioxidante y antiproliferativa de células cancerígenas. Por otro lado, en la investigación de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile* se obtuvo como resultado altos valores de actividad antioxidante los cuales fueron relacionados parcialmente a la presencia de ácidos fenólicos y cinámicos<sup>8</sup>.

Este estudio está orientado a determinar la presencia de polifenoles, evaluar las actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y el efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico del alga parda *Lessonia nigrescens* Bory, con el fin de aprovecharla en el desarrollo de productos dermocosméticos y, de esta forma, aportar a la industrialización de este abundante recurso del litoral peruano.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Determinar el contenido total de polifenoles, las actividades antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollar una forma dermocosmética.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el contenido total de polifenoles del extracto hidroalcohólico de *Lessonia nigrescens* Bory.
- b) Determinar las actividades antioxidante, antielastasa y anticolagenasa *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Lessonia nigrescens* Bory.
- c) Diseñar y elaborar una forma dermocosmética en base al extracto hidroalcohólico de *Lessonia nigrescens* Bory.
- d) Evaluar el efecto fotoprotector *in vivo* mediante análisis histopatológico.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Aspectos botánicos

##### 3.1.1 Clasificación taxonómica

Según el Sistema de Clasificación de Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2013, se tiene lo siguiente:

**División:** Phaeophyta

**Clase:** Phaeophyceae

**Orden:** Laminariales

**Familia:** Lessoniaceae

**Género:** *Lessonia*

**Especie:** *Lessonia nigrescens* Bory de Saint-Vincent

**Nombre común:** Aracanto (Perú), huiro negro (Chile).

##### 3.1.2 Descripción morfológica

El alga *Lessonia nigrescens* Bory es de color verde oliváceo, verde parduzco o casi negro y puede alcanzar una talla de hasta 4 m de largo. Se adhiere al sustrato por un disco adhesivo globoso, hemisférico, macizo y fuerte llamado rizoide. El rizoide puede medir hasta 50 cm de diámetro en plantas adultas. A partir del rizoide se origina uno o más ejes principales llamados estípites, que son cilíndricos en la base, gradualmente se comprimen en sentido apical y se dividen varias veces en forma dicotómica originando láminas que se distribuyen a lo largo de su eje. Las láminas son llamadas frondas, son lisas de borde entero, ondulado o con dientes romos y miden hasta 20 cm de largo con 4 cm de ancho <sup>12,13</sup>.



### 3.1.3 Distribución geográfica y hábitat

La especie *Lessonia nigrescens* Bory tiene una amplia distribución en la costa del Océano Pacífico, desde Mollendo en Perú (17° S) hasta el Cabo de Hornos en Chile (55°59' S)<sup>14</sup>.

El alga forma densos cinturones distribuidos en la zona intermareal y submareal de las costas rocosas expuestas y semi-expuestas al oleaje<sup>13,14</sup>. La extensión de estos cinturones varía dependiendo de la extensión del sustrato y el grado del oleaje<sup>12</sup>. Una característica de esta especie es que modifica el hábitat donde se desarrolla, por ejemplo provee de sustrato para el asentamiento larval y es un refugio para gran cantidad de invertebrados y peces<sup>12,13</sup>.

### 3.1.4 Uso tradicional

En el Perú el alga parda *Lessonia nigrescens* Bory es recolectada y exportada para la extracción de alginatos de alta calidad, el cual es usado como materia prima en diversos tipos de industrias.

Los alginatos son polisacáridos que se encuentran en la pared celular de las algas pardas. En su forma natural los alginatos se encuentran como sales mixtas de sodio, magnesio, potasio y calcio<sup>15,16</sup>. Es reconocido en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria por su uso como espesante, viscozante, gelificante, estabilizante de emulsiones y suspensiones y disgregante de comprimidos. Adicionalmente existen estudios sobre el uso de los alginatos en la producción de biopelículas y microcápsulas para la conservación de los alimentos<sup>17,18</sup>.

La recolección de las algas se realiza de manera netamente artesanal. Las personas involucradas exportan el alga bajo diferentes denominaciones: “algas frescas, refrigeradas, congeladas

o secas”; y sus principales destinos son Chile, China, Japón, Bolivia, Francia, Alemania, Noruega y Corea del Sur<sup>19</sup>.

### **3.2 Compuestos polifenólicos**

Los compuestos polifenólicos son compuestos químicos sintetizados por las plantas como producto de su metabolismo secundario. Son un conjunto heterogéneo de moléculas que se caracterizan por la presencia de uno o varios anillos fenólicos sustituidos por funciones hidroxílicas.

Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales (asimilación de nutrientes, síntesis proteica, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, etc.) mientras que otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.).

#### **3.2.1 Origen y estructura de los compuestos polifenólicos**

Los polifenoles constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de relativamente elevada masa molecular como los taninos hidrolizables y condensados<sup>6</sup>.

La biosíntesis de los polifenoles como resultado del metabolismo secundario tiene lugar a través de la ruta del ácido shikímico o de la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shikímico proporciona la síntesis de los fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc.), cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas y taninos. La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas<sup>15</sup>.

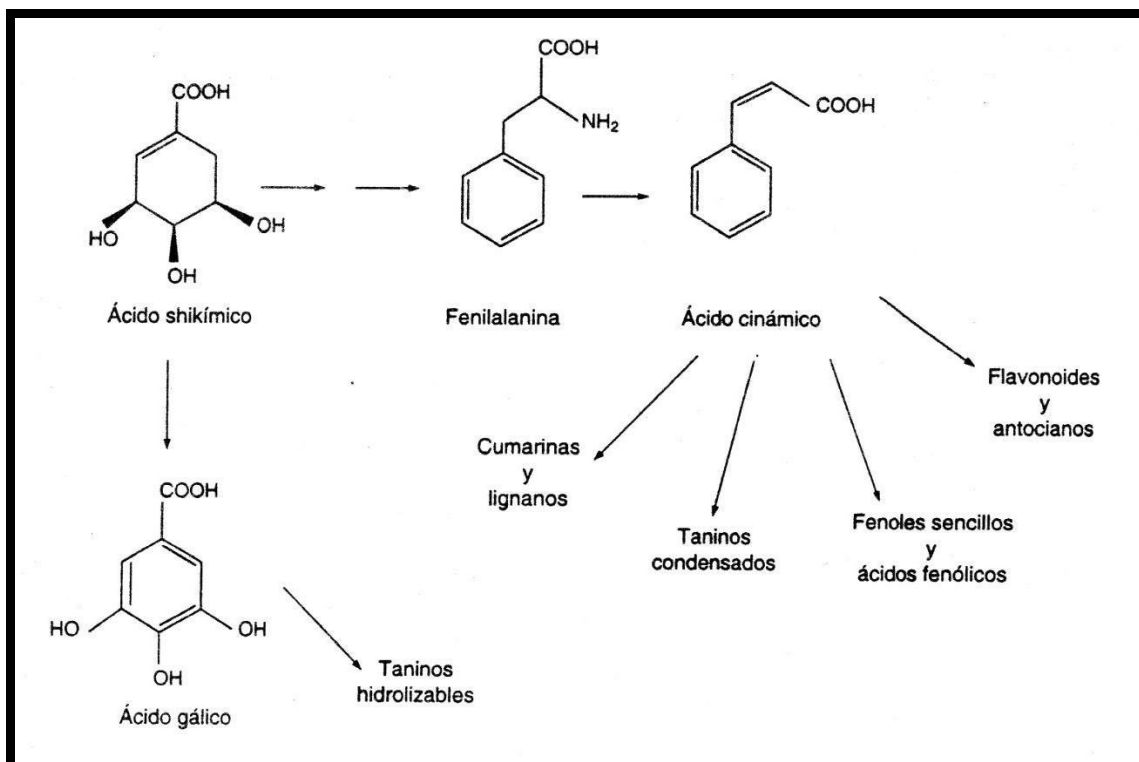


Figura 1. Biosíntesis de compuestos fenólicos<sup>15</sup>.

### 3.2.2 Actividad biológica de los polifenoles

Debido a su estructura química, los polifenoles presentan propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante. El grado de actividad antioxidante de los distintos compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular<sup>5</sup>.

La actividad antioxidante de los polifenoles es el origen de funciones biológicas como antienvjecimiento, anticancerígeno, antiinflamatorio, vasodilatador, antitrombótico y prevención de enfermedades cardiovasculares<sup>5-7</sup>.

### **3.3 Actividad antioxidante**

#### **3.3.1 Estrés oxidativo/nitrosativo**

El estrés oxidativo/nitrosativo es descrito en la literatura como un proceso en el cual se producen especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. El estrés oxidativo y nitrosativo es un proceso degenerativo que puede ser un importante mediador del daño a estructuras celulares, incluyendo lípidos y membranas, proteínas y ADN<sup>20,21</sup>. Sin embargo, en la actualidad se viene discutiendo que a bajos y moderados niveles las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno podrían funcionar como señales moleculares que regularían una serie de procesos fisiológicos, así como la defensa contra agentes infecciosos, el mantenimiento del tono vascular, el control de la ventilación y producción de eritropoyetina, y señal de transducción de los receptores de membrana en varios procesos fisiológicos<sup>20</sup>. Muchas respuestas ROS/RNS-mediadoras protegen las células en contra del estrés oxidativo/nitrosativo y mantienen la homeostasis redox. Luego, ambas especies reactivas son producidas por enzimas reguladoras, tales como la sintetasa de óxido nítrico (NOS), e isoformas de NADPH oxidasa, o como derivados de fuentes no muy bien reguladas, tales como la cadena transportadora de electrones mitocondrial.<sup>21</sup>

Por otro lado, el incremento del estrés oxidativo/nitrosativo usualmente describe una condición en la cual las defensas antioxidantes son inadecuadas para inactivar completamente a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROS/ERN). Se considera que las principales causas por las cuales las defensas del organismo llegan a ser insuficientes suelen estar relacionadas a la excesiva producción de EROS/ERN, la pérdida de defensas antioxidantes, o ambas. Una de las consecuencias principales del estrés oxidativo/nitrosativo es el daño de moléculas de ácidos

nucleicos, lípidos y proteínas, las cuales pueden comprometer severamente la salud y viabilidad celular o inducen una variedad de respuestas celulares a través de la generación de especies reactivas secundarias, causando la muerte celular por necrosis o apoptosis. Este daño molecular, si no es controlado, puede contribuir al desarrollo de enfermedades<sup>21</sup>.

El proceso de estrés oxidativo y la producción de las especies reactivas de oxígeno están relacionados con la naturaleza del oxígeno el cual se encuentra manera habitual en su forma más estable (O<sub>2</sub>) en estado molecular con sus electrones apareados. Así el oxígeno es poco reactivo, con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo por reacciones puramente químicas, reacciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se puede producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo produciendo daño celular<sup>22,23</sup>.

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen la ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>23,24</sup>.

### **3.3.2 Radicales libres**

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital

externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad<sup>22,23</sup>.

Esta propiedad de tener electrones desapareados le puede conferir al radical una enorme reactividad química, que le conducirá a interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas (radicales o no) con las que entren en contacto, tendiendo a ceder este electrón extra para estabilizar su orbital de valencia (radical reductor), a aceptar un electrón para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante), o a unirse a un no radical, en cuyo caso, este último se convierte en un radical libre. Mediante estos mecanismos los radicales libres dan lugar a reacciones en cascada con formación de nuevos radicales libres. Solo cuando coinciden dos radicales pueden combinar sus electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente, terminando así con dichas reacciones, aunque pueden existir de manera estable compuestos en forma de radical libre<sup>22</sup>.

### **3.3.3 Peroxidación lipídica**

La peroxidación lipídica es un proceso complejo que involucra la formación y propagación de radicales lipídicos, el consumo de oxígeno, un reordenamiento de los dobles enlaces en lípidos insaturados y eventualmente la destrucción de la membrana lipídica, con la producción de una variedad de productos de degradación, incluyendo alcoholes, cetonas, alcanos, aldehídos y éteres<sup>24</sup>.

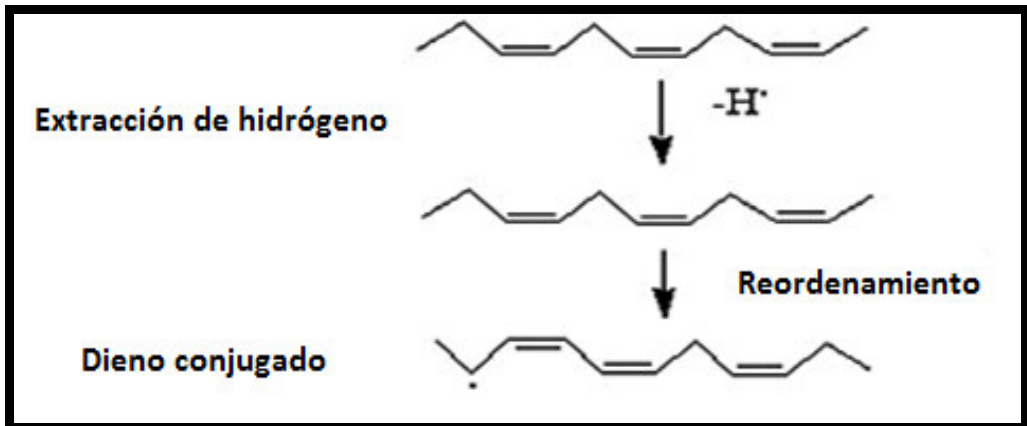
El daño sobre la membrana está inicialmente acompañado por alteraciones en sus propiedades biológicas, tales como el incremento del grado de fluidez de la membrana y las funciones de barrera. Los abundantes productos de la peroxidación lipídica como los hidroperóxidos o sus aldehídos derivados inhiben la síntesis de proteínas, la acción de los macrófagos de la sangre y altera las

señales quimiotácticas y la actividad enzimática. Dichas alteraciones podrían afectar la función celular normal e incrementar la permeabilidad tisular<sup>21,24</sup>.

En situaciones patológicas las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno son generadas en cantidades más elevadas que lo normal<sup>24</sup>. El mecanismo de daño biológico y toxicidad de estas especies reactivas sobre sistemas biológicos es actualmente explicado secuencialmente y se observa en los siguientes procesos: estrés oxidativo reversible y del daño oxidativo irreversible.

El daño oxidativo puede observarse a través del mecanismo de la peroxidación lipídica. Esta es una reacción en cadena que inicia con la extracción de hidrógeno o la adición de oxígeno radical, resultando en un daño oxidativo por ácidos grasos poliinsaturados. Debido a que ácidos grasos insaturados son más sensibles que los saturados, el puente activado de metileno representa un sitio blanco crítico<sup>24</sup>.

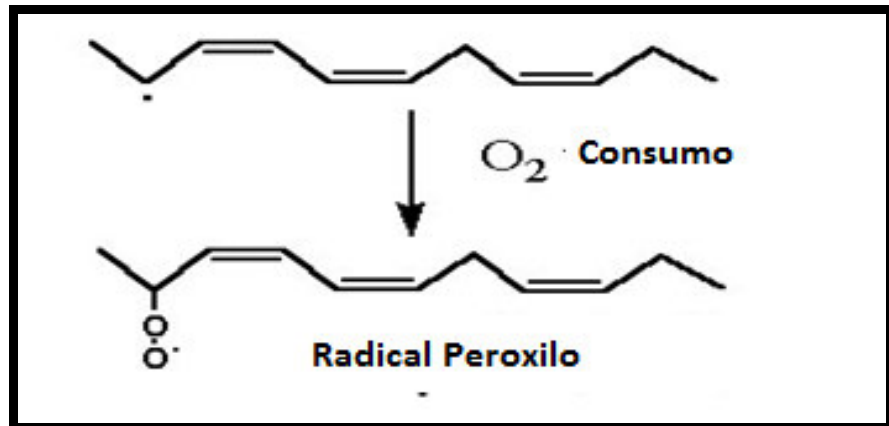
La presencia de un doble enlace adyacente para un grupo metileno hace al enlace metileno débil y, por lo tanto, el hidrógeno es más susceptible a la extracción. Este deja un electrón desapareado en un carbono, formando un radical carbono central, el cual es estabilizado por un reordenamiento molecular de dobles enlaces para formar un dieno conjugado, el cual luego se combina con oxígeno para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo es en sí mismo capaz de extraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado y por lo tanto de iniciar una reacción en cadena<sup>24</sup>.



**Figura 2.** Paso de iniciación del proceso de peroxidación lipídica<sup>24</sup>.

El oxígeno molecular se agrega rápidamente a los radicales carbono centrales ( $R^*$ ) formados en este proceso, generando radicales peroxilo lipídicos ( $ROO^*$ ). La descomposición de peróxidos lipídicos es catalizada por complejos de metales de transición ( $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  y  $Cu^{+1}/Cu^{+2}$  principalmente) generando radicales alcóxilo ( $RO^*$ ) o hidroxilo ( $OH^*$ ), los que participan en la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. La formación de radicales peroxilo conduce a la producción de hidroperóxidos orgánicos los cuales pueden sustraer hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado. Esta reacción que es entendida como propagación, implica que un solo golpe resulta en la conversión de numerosos ácidos grasos poliinsaturados a hidroperóxidos lipídicos. El ácido graso radical resultante es estabilizado por reordenamiento en un dieno conjugado que retiene los productos más estables incluidos hidroperóxidos, aldehídos y alcanos. Hidroperóxido lipídico ( $ROOH$ ) es el primer producto de la reacción de peroxidación lipídica, comparativamente estable<sup>23,24</sup>.





**Figura 3.** Fase inicial del paso de propagación del proceso de peroxidación lipídica indicando el consumo de oxígeno<sup>24</sup>.

Complejos de hierro reducido ( $Fe^{+2}$ ) reaccionan con peróxido lipídico (ROOH) para dar radicales alcoxilo, mientras que complejos de hierro oxidado ( $Fe^{+3}$ ) reaccionan más lentamente para producir radicales peroxilo. Ambos radicales pueden tomar parte en la propagación de la reacción en cadena. Los productos finales de estas degradaciones de complejos metal ión-catalizador de hidroperóxidos lipídicos incluyen a los aldehídos citotóxicos y gases hidrocarburo como el etano<sup>24,25</sup>.

La reacción en cadena de radicales libres propagan hasta dos radicales libres conjugados entre otros para terminar la cadena. La reacción también puede terminar en presencia de un antioxidante "rompedor de cadena" como la vitamina E ( $\alpha$ -tocopherol)<sup>24,25</sup>.

En condiciones en las cuales la peroxidación lipídica es continuamente iniciada esta genera productos no radicales destruyendo dos radicales a la vez. En presencia de iones de metales de transición, ROOH puede generar un aumento para la generación de radicales capaces de reiniciar la peroxidación lipídica por un ciclo redox de estos iones metálicos<sup>25</sup>.

### **3.3.4 Peroxidación lipídica y envejecimiento**

El envejecimiento es un proceso directamente relacionado con el estrés oxidativo sistémico. Dos componentes en el envejecimiento humano han sido reconocidos: una disminución en la disponibilidad de moléculas nutricionales antioxidantes y una acumulación de productos derivados de la oxidación de estructuras biológicas. La oxidación de biomoléculas está relacionada con la susceptibilidad a enfermedades, por ejemplo el cáncer y las enfermedades cardíacas, así como también está asociada con el proceso de envejecimiento.

Los productos derivados de la peroxidación lipídica, medidos en plasma por Junqueira et al., (2004) como productos fluorescentes, fueron más elevados en ancianos que en humanos jóvenes y mucho más elevados en discapacitados octogenarios y nonagenarios. Este incremento en los productos de la peroxidación lipídica estuvo directamente relacionado con la edad, y fue asociado con la disminución de vitamina E y C<sup>24</sup>.

### **3.3.5 Sistema antioxidante**

Los seres humanos han desarrollado un sistema complejo de antioxidante (enzimático y no enzimático), el cual trabaja sinérgicamente, entre sí para proteger las células y los sistemas del cuerpo contra el daño de los radicales libres<sup>26</sup>.

Se entiende por sistema antioxidante al grupo de sustancias que al estar presente en bajas concentraciones con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este<sup>21</sup>.

### 3.3.6 Sustancias antioxidantes

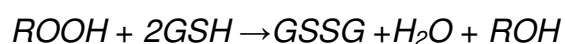
Los antioxidantes pueden ser endógenos o ser obtenidos exógenamente como parte de la dieta o suplementos dietéticos. Algunos componentes dietéticos que no neutralizan radicales libres, pero que aumentan la actividad endógena, también pueden ser clasificados como antioxidantes<sup>23-25</sup>.

Los antioxidantes exógenos juegan un rol crítico en mantener funciones celulares óptimas y, por lo tanto, la salud sistémica y el bienestar general. Sin embargo, bajo condiciones que soportan estrés oxidativo y nitrosativo, antioxidantes endógenos podrían ser requeridos para mantener funciones celulares óptimas.

Los antioxidantes enzimáticos más eficientes comprenden glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa. Antioxidantes no enzimáticos incluyen Vitamina E y C, tiol antioxidantes (glutatión, tioredoxin y ácido lipoico), melatonina, carotenoides, flavonoides naturales y otros compuestos. Algunos antioxidantes pueden interactuar con otros antioxidantes regenerando sus propiedades originales; este mecanismo es referido como “red antioxidante”<sup>24</sup>.

#### 3.3.6.1 Antioxidantes enzimáticos

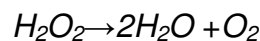
**Glutatión peroxidasa:** las glutatión peroxidases son enzimas que catalizan la oxidación del glutatión produciendo un hidroperóxido, el cual puede ser peróxido de hidrógeno u otra especie tal como un hidroperóxido lipídico.



Otros peróxidos, incluidos los hidroperóxidos lipídicos, pueden también actuar como sustratos para esas enzimas, las cuales podrían por esta razón jugar un rol en la reparación de daño

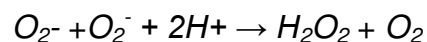
resultante de la peroxidación lipídica. Existen dos formas de esta enzima, una que es selenio dependiente (GPx, EC1.11.1.19) y otra que es selenio independiente (glutación uno-S-transferasa, GST, EC 2.5.1.18). La diferencia radica en el número de subunidades, mecanismo catalítico y el centro activo para la unión del selenio<sup>23,24</sup>.

**Catalasa:** (EC 1.11.1.6) fue la primera enzima antioxidante en ser caracterizada. Cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.



La catalasa está formada por cuatro unidades, cada una contiene un grupo hemo y una molécula de NADPH. El ratio constante de la reacción descrita líneas arriba es extremadamente elevado (aproximadamente  $10^7$  M/s), por lo que es virtualmente imposible saturar la enzima *in vivo*. Esta enzima está presente en el peroxisoma de células aeróbicas y es muy eficiente promoviendo la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular<sup>23,24</sup>.

**Superóxido dismutasa:** (EC 1.15.1.1) es uno de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más potente. Cataliza la conversión de aniones superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.



El peróxido de hidrógeno es removido por la catalasa o glutación peroxidasa, como se describe líneas arriba<sup>23,24</sup>.

### 3.3.6.2 Antioxidantes no enzimáticos

**Vitamina E:** es una vitamina liposoluble que existe en ocho formas diferentes. El tocoferol en sus formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$  tiene un anillo cromanol y una cola fitil, estos difieren en el número y posición de los grupos metil en el anillo. Estos reaccionan más rápido que los ácidos grasos poliinsaturados con radicales peroxilo y por lo tanto

actúan para romper la reacción en cadena de peroxidación lipídica. Adicionalmente a su rol antioxidante, la vitamina E podría tener además un rol estructural en estabilizar membranas. La deficiencia de vitamina E es rara en humanos, a pesar de que podría causar hemólisis y contribuir a la neuropatía perineal que ocurre en abetalipoproteinemia<sup>24</sup>.

En membranas celulares y lipoproteínas la función antioxidante esencial de la vitamina E es de atrapar radicales peroxil y romper la cadena de reacción de peroxidación lipídica. La vitamina E no previene la formación inicial de radicales de carbonos centrales en un ambiente rico de lípidos, pero minimiza la formación de radicales secundarios.  $\alpha$ -tocoferol es el antioxidante más efectivo de los tocoferoles y es el más abundante en humanos. Es rápidamente reactivo con un radical peróxido para formar un radical tocoferol estable, con el exceso de carga asociado con el electrón extra siendo dispersado a través del anillo cromanol<sup>23,24</sup>. Esta resonancia estabilizante del radical podría reaccionar subsecuentemente en una de muchas formas. El  $\alpha$ -tocoferol podría ser regenerado por reacción en la interfase acuosa con ascorbato u otro antioxidante de fase acuosa rompedor de cadena, como el glutatión reducido o urato. Como otra opción, dos radicales  $\alpha$ -tocoferol podrían combinarse para formar un dímero estable, o el radical podría ser completamente oxidado para formar tocoferol quinona<sup>23-25</sup>.

**Vitamina C (ácido ascórbico):** es un antioxidante importante que trabaja en el medio acuoso del cuerpo. Asimismo, el ácido ascórbico puede ser oxidado en el medio extracelular en presencia de iones metálicos a ácido dehidroascórbico, el cual es transportado al interior de la célula a través del transportador de glucosa.

La vitamina C está relacionado con otros antioxidantes, principalmente con la vitamina E y los carotenoides. La vitamina C coopera con la vitamina E para regenerar  $\alpha$ -tocoferol a partir de

radicales  $\alpha$ -tocoferol en membranas y lipoproteínas, y también incrementa los niveles de glutatión en las células, por lo tanto juega un importante rol en la protección del grupo proteínico tiol contra la oxidación. Además, la vitamina C al ser un agente reductor, puede reducir y por lo tanto neutralizar especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno<sup>23,24</sup>.

**Antioxidantes tiólicos:** el antioxidante tiólico más importante es el glutatión tripéptido (GSH), el cual es un antioxidante multifuncional intracelular. Es reconocido por ser el mayor buffer redox disulfurado de la célula<sup>24</sup>. Es abundante en el citosol, núcleo y mitocondrias, y es el mayor antioxidante soluble en los compartimientos celulares. Además, el glutatión es importante por jugar un rol en la senescencia de acuerdo a estudios que involucran fibroblastos humanos. Dichos estudios han demostrado que los niveles de glutatión intracelular tiene una influencia importante en la inducción de un fenotipo post-mitótico y, que la consiguiente depleción de glutatión juega un rol significativo en el envejecimiento celular en la piel humana.

Este antioxidante se presenta en el organismo en su forma reducida: GSH (glutatión); o en su forma oxidada: GSSG (glutatión disulfuro). La capacidad antioxidante de los compuestos tiólicos se debe al átomo de azufre, el cual puede acomodar la pérdida de un electrón desapareado fácilmente. El glutatión oxidado (GSSG) es acumulado dentro de las células, lo que hace que la relación de GSH/GSSG sea una buena medida del estrés oxidativo de un organismo. El rol protector de glutatión contra el estrés oxidativo/nitrosativo radica en que puede actuar como co-factor para muchas enzimas detoxificadoras; participar en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; recuperar directamente radicales hidroxilo y oxígeno singulete; y regenerar las vitaminas C y E de regreso a sus formas activas<sup>23-25</sup>.

**Carotenoides:** los carotenoides son un grupo de antioxidantes solubles en lípidos los cuales están conformados por un esqueleto de isoprenoide de carbono. El más importante de estos es el  $\alpha$ -caroteno debido a que se encuentra presente en membranas y lipoproteínas. Estos son particularmente colectores eficientes de oxígeno singulete, pero pueden también atrapar radicales peroxilo a bajas concentraciones de oxígeno con una eficiencia por lo menos mayor al  $\alpha$ -tocoferol. Debido a estas condiciones de prevalecer en muchos tejidos biológicos, los carotenoides juegan un rol en prevenir la peroxidación lipídica *in vivo*. Los carotenoides que poseen anillos beta son reconocidos por tener actividad provitamina A; la mayor actividad es representada por el  $\beta$ -caroteno porque posee dos anillos beta a cada extremo de la cadena de carbonos. La vitamina A tiene además propiedades antioxidantes que no muestran dependencia a la concentración de oxígeno<sup>24,25</sup>.

Existen otros grupos no menos importantes de antioxidantes que comprenden tioredoxina, ácido lipoico, N-acetil cisteína, melatonina y flavonoides<sup>23</sup>.

### **3.4 Piel y envejecimiento**

#### **3.4.1 Estructura de la piel**

La piel es uno de los órganos más importantes del ser humano, tanto por su tamaño como por sus funciones. Es el órgano más grande del cuerpo, en un adulto logra ocupar un área de aproximadamente dos metros cuadrados. La piel cumple una amplia variedad de funciones: es una barrera contra agresiones mecánicas, químicas y tóxicas, radiaciones ultravioleta y microorganismos patógenos. Además, la piel mantiene el equilibrio de fluidos corporales actuando como barrera ante la posible pérdida de agua, mantiene la termorregulación y es la responsable de la

transmisión de la información del exterior a través de estímulos sensoriales. La piel consta de tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis<sup>27-29</sup>.

**La epidermis:** es la capa más externa de la piel. Es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal. Presenta un espesor variable, con un valor medio de 0,1 mm, pudiendo alcanzar en zonas como las plantas de los pies y las palmas de las manos espesores de hasta 1 ó 2 mm<sup>30</sup>.

Está normalmente compuesta por cuatro capas (estratos) diferentes que desde el exterior hacia el interior son:

- ◆ Estrato córneo (*stratum corneum*).
- ◆ Estrato granular (*stratum granulosum*).
- ◆ Estrato espinoso (*stratum spinosum*).
- ◆ Estrato basal (*stratum basale*).

En aquellas zonas donde se presenta con un mayor grosor, la epidermis tiene cinco capas al contar con el estrato lúcido (*stratum lucidum*), la cual está situada entre la capa córnea y la granular.

La epidermis está formada por queratinocitos los cuales se encargan de sintetizar la queratina, proteína estructural insoluble en agua con gran resistencia a la degradación enzimática. En la epidermis también se encuentran los melanocitos, responsables de la síntesis de melanina que es el pigmento que da color a la piel y nos protege de los rayos ultravioleta; las células de Langerhans que forman parte del sistema inmunitario y las células de Merkel que son células sensoriales y están situadas en el estrato basal<sup>28</sup>.

**La dermis:** es la estructura que le da soporte a la piel, además le otorga resistencia y elasticidad. La dermis es la capa más gruesa de



la piel, su grosor máximo es de 5 mm y está compuesta por tejido de tipo fibroelástico<sup>28,29</sup>. Consta de dos capas:

- ◆ Estrato papilar (*stratum papillare*): se caracteriza por la presencia de proyecciones cónicas hacia el interior de la epidermis llamadas papilas, las cuales contienen las asas capilares. También se encuentran terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos<sup>28,30</sup>.
- ◆ Estrato reticular (*stratum reticulare*): es la capa más profunda y gruesa. Está formada por un entramado de fibras colágenas que forman gruesos haces entrelazados con haces de fibras elásticas. Además contiene los anexos cutáneos, los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los nervios<sup>27,28</sup>.

**La hipodermis:** está formado por células adiposas, las cuales se especializan en la acumulación de grasas. Esta capa tiene por función el mantenimiento del calor corporal, protección en caso de golpes y es un reservorio de energía<sup>27</sup>.

### 3.4.2 Envejecimiento cutáneo

El envejecimiento cutáneo es un proceso continuo en el que se producen cambios fisiológicos y morfológicos en la piel. Ocurre un declive en las funciones biológicas y en la habilidad para adaptarse al estrés metabólico<sup>31</sup>. Existen dos aspectos que se relacionan a estos cambios: el envejecimiento intrínseco (resultado del paso del tiempo, herencia genética) y el envejecimiento extrínseco (causado por la radiación solar, factores ambientales, hábitos personales)<sup>31-34</sup>.

El envejecimiento intrínseco resulta por la acumulación de daño celular por exceso de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. El daño asociado con la edad incluye la oxidación de ADN, proteínas y membranas lipídicas lo cual conlleva

a la aparición de mutaciones y disminución de la eficiencia en el transporte y pasaje trans-membrana<sup>32</sup>. Con este daño acumulativo, la célula va perdiendo su capacidad antioxidante.

Durante el proceso de envejecimiento, la piel experimenta cambios estructurales significativos. Las alteraciones epidérmicas más importantes recaen sobre el estrato basal o germinativo y sobre la unión dermoepidérmica, la cual sufre un aplanamiento progresivo reduciendo la superficie de contacto entre la epidermis y la dermis. Este cambio se traduce en una piel más fina y frágil<sup>31</sup>.

Otra característica de la piel envejecida es la disminución de la división celular de los queratinocitos. Estas células entran en un estado de senescencia, permaneciendo en la fase de reposo del ciclo celular. Durante este periodo, las células acumulan lesiones sobre las proteínas, los lípidos y el ADN causados por el estrés oxidativo. Cuando este daño proteico y genético llega a un cierto grado se pueden producir neoplasias<sup>30</sup>.

A nivel de la dermis también ocurren cambios propios del paso del tiempo. En la piel joven, el colágeno le da soporte a la piel. Con los años y la exposición solar las fibrillas de colágeno son reemplazadas por una sustancia amorfa, homogénea y sin función, lo que se conoce como elastosis solar. Entre las fibras elásticas se produce un depósito de proteoglicanos y glucosaminoglucanos, restando la capacidad de fijación del agua<sup>31</sup>.

Estos cambios conllevan a la aparición de arrugas en la piel, pérdida de elasticidad y flexibilidad, hiperpigmentaciones, sequedad cutánea y descamación.

### 3.4.3 Fotoenvejecimiento

Los efectos clínicos producidos por las radiaciones ultravioleta (UV) en forma crónica sobre la piel se llaman fotoenvejecimiento, el cual es independiente del envejecimiento biológico de la piel<sup>30</sup>. Estos cambios no solamente son estructurales, sino que suponen una aceleración de la pérdida progresiva de las funciones cutáneas.

La luz ultravioleta (UV) forma parte del espectro electromagnético y se sitúa en el rango de 100 nm a 400 nm de longitud de onda. Está clasificada en tipo A (315 – 400 nm), tipo B (280 – 315 nm) y tipo C (100 – 280 nm). El sol es la principal fuente de luz UV. La intensidad de la luz solar UV que alcanza la superficie terrestre está mediada por la atmósfera terrestre. Durante el paso de la luz UV por la atmósfera se produce la absorción de moléculas de oxígeno y ozono, con ello la capa de ozono nos protege de casi la totalidad de radiación UV de longitud de onda menor a 290 nm y una gran fracción de 290 – 315 nm desde que alcanza la superficie terrestre. De allí se deduce que el daño a la exposición terrestre oscila entre 290 y 400 nm, a su vez la radiación UVC es absorbida casi completamente por el ozono<sup>33</sup>.

La exposición continua a la radiación ultravioleta (UV) trae efectos que no son inmediatos. Las personas que se asolean en la adolescencia y al inicio de la segunda década tendrán luego hacia la tercera o cuarta década daños generados en las capas profundas de la piel por degeneración celular<sup>34</sup>. Las radiaciones correspondientes al UVB penetran hasta la epidermis, mientras que las del tipo UVA penetran más profundamente en la piel llegando hasta la dermis<sup>35</sup>.

Desde el punto de vista molecular, el fotoenvejecimiento difiere del envejecimiento intrínseco por dos razones principales: la acumulación de mayor número de mutaciones genéticas que aumenta la posibilidad de malignidad; y por la señal celular inducida

por la radiación ultravioleta que posee una acción pro-inflamatoria, que estimula la degradación de la matriz de colágeno<sup>32</sup>.

La piel del rostro, cuello, antebrazos y manos es la más fotoexpuesta por lo tanto sufre de mayor deterioro que el resto de la piel corporal. Los cambios clínicos son básicamente alteraciones en la pigmentación, piel áspera, arrugas profundas, telangiectasias, púrpura solar o senil, queratosis solares, epitelomas espinocelulares o basocelulares y neoplasias cutáneas<sup>31,35</sup>.

### **3.5 Fotoprotección**

El objetivo de la fotoprotección es prevenir los daños causados por la radiación ultravioleta sobre la piel, tales como el fotoenvejecimiento, quemaduras solares o fotocarcinogénesis. Consiste en evitar la exposición solar excesiva y el uso de ropa, accesorios y protectores solares que cubran el área de la piel expuesta a la radiación solar.

#### **3.5.1 Barreras físicas**

La medida más importante para la fotoprotección es el desarrollo de hábitos saludables evitando o disminuyendo el tiempo de exposición a la radiación solar. El uso de ropa adecuada reduce el riesgo de aparición de nuevos nevus (lunares). El efecto fotoprotector de la ropa depende principalmente de la trama, que debe ser apretada para que llegue menos radiación a la piel<sup>30</sup>. Por ejemplo, el nylon, la lana, la seda y el poliéster ofrecen mayor protección que el algodón y el lino<sup>36,37</sup>. El uso de sombrero ofrece protección para la cara, los pabellones auriculares y el cuello. En este caso mientras más ancho sea el ala del sombrero, mayor es la protección. En comparación con los protectores solares, el uso de ropa adecuada y sombreros ofrece protección uniforme contra los rayos UVA y UVB. Además, el

tiempo de protección es tan largo como las personas recuerden usarlos.

El uso de lentes de sol también forma parte de las medidas para la fotoprotección. Estos protegen los ojos y las áreas vecinas de los daños de la radiación UV, por lo tanto previenen el desarrollo de cáncer de piel, daños a la retina, córnea y conjuntiva. Los lentes de sol deben tener filtros contra los rayos UV sin sacrificar la transmisión de la luz visible<sup>36</sup>.

### 3.5.2 Protectores solares

Los protectores solares son sustancias que absorben y filtran la radiación UV o las dispersan y reflejan. En ambos casos se evita la penetración de la radiación UV hacia la epidermis y dermis, lo que previene la incidencia de cáncer de piel y disminuye los signos del envejecimiento. El correcto uso de los protectores solares asegura su efectividad; se recomienda aplicar el producto 15 a 30 minutos antes a la exposición solar y reaplicarlo cada una o 2 horas dependiendo de la actividad física que se realice<sup>37,38</sup>.

**Protectores físicos:** también llamados protectores inorgánicos, se caracterizan por actuar como barrera física absorbiendo y dispersando la radiación UV. La FDA solo ha aceptado dos sustancias como filtros inorgánicos: el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y el óxido de zinc (ZnO)<sup>39</sup>. Ambas sustancias tienen la ventaja de que son fotoestables, proporcionando a los protectores solares grados de fotoprotección predecibles después de la exposición UV; no se absorben más allá del estrato córneo y tienen bajos niveles de potencial alergénico. La desventaja de los filtros físicos es que las formulaciones son de apariencia opaca y dejan una película de color blanquecina al aplicarse sobre la piel<sup>40</sup>.

El dióxido de titanio es un filtro de amplio espectro que provee protección contra los rayos UVB y UVA II (315 – 340 nm) pero carece de cobertura frente a UVA I (340 – 400 nm). Por otro lado, el óxido de zinc cubre predominantemente el espectro UVA, siendo no muy eficiente en el rango del UVB<sup>40</sup>.

**Protectores químicos:** también conocidos como protectores orgánicos, se caracterizan por absorber la radiación UV hacia su estructura de anillos aromáticos conjugados. Una vez que existe la exposición UV, los electrones de estos compuestos son energizados y saltan hacia un excitado e inestable estado. A su tiempo, los electrones regresan a su estado estable y liberan la energía en forma de calor<sup>39</sup>. Los protectores químicos se dividen a su vez en los que absorben radiaciones UVB y los que absorben radiaciones UVA.

Los protectores químicos que absorben la radiación UVB son los aminobenzoatos, los salicilatos, los cinamatos y el octocrileno. Los aminobenzoatos son derivados de ácido paraaminobenzoico (PABA) cuyo uso se ha limitado debido a las reacciones adversas cutáneas producidas<sup>36</sup>. Entre los salicilatos se encuentran el octisalato, el homosalato y la trolamina salicilato y su rango de absorción es de 290 a 315 nm. Los cinamatos son el octinoxato (octylmethoxycinnamate) y el cinoxato (2-ethoxyethyl-pmethoxycinnamate), su rango de absorción es de 270 a 328 nm. Otorgan a las formulaciones, además, resistencia al agua y bajo potencial de irritación a la piel. El octocrileno (2-ethylhexyl-2cyano-3,3-diphenylarylate) tiene un rango de absorción de 290 a 360 nm, posee un excelente perfil de seguridad con bajo potencial de irritación, fototoxicidad y fotoalergénico. Sin embargo pierde su eficacia al exponerse al agua o sudor<sup>39,40</sup>.

Los protectores químicos que absorben radiación UVA son las bezofenonas, las antralinas, la avobenzona y el ácido tereftalideno-

dialcanfor sulfónico (Meroxyl SX). Las bezofenonas son un grupo de cetonas aromáticas entre las que destaca la oxybenzona (benzophenone-3), siendo su rango de absorción de 270 a 350 nm. Este compuesto ha sido considerado como uno de lo más alérgenos que existen pues está implicado en diversos casos de dermatitis fotoalérgica<sup>36,39</sup>. Las antralinas son filtros UV débiles y son menos efectivos que las bezofenonas<sup>40</sup>. La avobenzona (butyl methoxydibenzoylmethane) tiene un perfil de absorción de 310 a 400 nm y es el filtro orgánico que provee una mayor protección contra los rayos UVA. A pesar de su eficacia, la avobenzona es foto inestable y puede degradarse una hora después de la exposición solar con pérdida de un 50 a 90% de las moléculas<sup>39,40</sup>. El meroxyl SX provee una protección contra el rango UVA de 290 a 390 nm. El compuesto es foto estable, resistente al agua y tiene baja absorción sistémica<sup>40</sup>.

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

La investigación es experimental, prospectivo y de causa – efecto.

### 4.1 Materiales y métodos

#### 4.1.1 Materiales

Tubos de ensayo, gradillas, placa de toques, matraces, micropipetas, probetas, vaso de precipitado, fiolas, cubetas de plástico, baguetas, celdas

#### 4.1.2 Reactivos

**Reactivos químicos:** reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, ácido gálico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), metanol, 2,2'-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 (AAPVN), buffer Tris-Glicine 50mM con 400mM NaCl y 10mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.5, N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), ácido fórmico 10 %, formol neutro.

**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, Merck, Baker y Aldrich.

#### 4.1.3 Equipos

Molino de cuchillos, tamiz, balanza analítica Ohaus sensibilidad 0,1 mg, centrífuga IEC, espectrofotómetro GENESYS™ 10S UV-VIS,



estufa de convección natural, baño maría Memmert, lámpara de luz UV, microscopio electrónico Giardino.

## **4.2 Preparación de la muestra**

### **4.2.1 Colecta del material biológico**

La muestra de la macroalga *Lessonia nigrescens* Bory fue colectada en la playa Yanyarina del distrito San Juan de Marcona, provincia de Nazca, región Ica en Marzo del 2013.

### **4.2.2 Clasificación taxonómica**

La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el sistema de clasificación de Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2013. Anexo A.

### **4.2.3 Tratamiento de la muestra**

El alga de estudio fue separada de acuerdo a sus tres partes: rizoide, estípide y fronda. Luego, se lavó con abundante agua destilada y se secó dentro de una estufa a temperatura de 40 °C. Finalmente se realizó la molienda y el tamizado hasta obtener polvo de alga de cada una de las partes.

### **4.2.4 Preparación del extracto**

Se realizó una maceración hidroalcohólica (EtOH/H<sub>2</sub>O) en proporción 1:1 del rizoide, estípide y fronda durante una semana. Posteriormente se filtró cada uno de los extractos y se secó en estufa a temperatura de 40 °C.

### **4.3 Marcha fitoquímica**

Se realizó con cada uno de los extractos obtenidos, empleando reactivos de coloración y precipitación para la detección de los metabolitos secundarios<sup>41</sup>.

### **4.4 Determinación de polifenoles totales. Método de Folin – Ciocalteu<sup>42</sup>**

#### **4.4.1 Fundamento**

Los polifenoles de una muestra se determinan colorimétricamente usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual contiene molibdato y tungstato sódico que reaccionan con los fenoles formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) que tienen un máximo de absorción a 765 nm.

#### **4.4.2 Procedimiento**

Se pesó 3 g de cada muestra de polvo seco de alga. Cada muestra (rizoide, estípide y fronda) fue colocada en un matraz y se agregó 25 mL de metanol 70 %. Se colocó en baño maría a temperatura de 50 °C con agitación constante durante 30 minutos. Finalizado el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se colocó cada extracto en un tubo de centrifuga. Se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm. Se separaron los sobrenadantes en una fiola de 50 mL cada uno. Se agregó 25 mL de metanol 70 % frío a cada tubo. Se centrifugó por segunda vez por 10 minutos a 3500 rpm. Los sobrenadantes fueron separados en su respectiva fiola. Se completó el volumen del extracto a 50 mL con metanol 70 %.

Una vez obtenidos los extractos se realizó la determinación de los polifenoles totales de acuerdo a lo siguiente:

**Tabla 1.** Preparación de tubos de reacción para la determinación de polifenoles totales

	<b>TUBO BLANCO</b>	<b>TUBO MUESTRA</b>	<b>TUBO ESTÁNDAR</b>
<b>AGUA DESTILADA</b>	100 µL	-	-
<b>MUESTRA PROBLEMA</b>	-	100 µL	-
<b>ESTÁNDAR (ácido gálico)</b>	-	-	100 µL
<b>REACTIVO FOLIN –CIOCALTEU 0,2N</b>	500 µL	500 µL	500 µL
Agitar y esperar de 3 a 5 minutos			
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% w/v</b>	400 µL	400 µL	400 µL
Agitar y dejar en reposo durante una hora en oscuridad. Leer a 765 nm.			

La lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro de luz UV –VIS a longitud de onda de 765 nm. Se preparó la curva de calibración del estándar ácido gálico a concentraciones de 25; 50; 75; 100 y 125 µg/mL. El contenido de polifenoles totales (CPT) lo expresamos como equivalentes de ácido gálico.

## 4.5 Determinación de la actividad antioxidante

### 4.5.1 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)<sup>43</sup>

#### 4.5.1.1 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 se expresa en IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir al 50 % el DPPH).

#### 4.5.1.2 Procedimiento

Se preparó la solución stock de DPPH al 40 % usando metanol como disolvente. Luego se diluyó la solución stock de DPPH con metanol hasta obtener una absorbancia entre 0,6 – 0,7 a 517 nm.

Se realizó el mismo procedimiento para la muestra de rizoide, estípide y fronda. Cada extracto se disolvió en una mezcla de etanol – agua (1:1) y se realizaron diluciones de concentración final de 1; 5; 10; 15 y 20 mg/mL

**Tabla 2.** Preparación de tubos de reacción para el método de captación de DPPH.

	TUBO BLANCO	TUBO CONTROL DPPH	TUBO MUESTRA
<b>METANOL</b>	800 µL	-	-
<b>ETANOL-AGUA (1:1)</b>	400 µL	400 µL	-
<b>MUESTRA</b>	-	-	400 µL
<b>DPPH</b>	-	800 µL	800 µL
Reposar por 30 minutos alejado de la luz. Leer a 517 nm.			

Se realizó una curva de calibración del estándar Trolox® a concentraciones de 1,2; 3,6; 7,2 y 10 µg/mL. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Se calculó el IC50 del extracto hidroalcohólico del rizoides, del estípites, de la fronda y del estándar Trolox®.

#### 4.5.2 Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)<sup>43</sup>

##### 4.5.2.1 Fundamento

El radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> 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 ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) 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 una muestra se expresa en IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir al 50 % el ABTS<sup>•+</sup>).

##### 4.5.2.2 Procedimiento

Se preparó una solución acuosa stock de ABTS 7 mM, 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.

Se realizó el mismo procedimiento para la muestra de rizoide, estípite y fronda. Cada extracto se disolvió en una mezcla de etanol – agua (1:1) y se realizaron diluciones de concentración final de 10; 30; 50 y 70 mg/mL

**Tabla 3.** Preparación de tubos de reacción para el método de captación de ABTS<sup>•+</sup>.

	<b>TUBO BLANCO</b>	<b>TUBO CONTROL ABTS</b>	<b>TUBO MUESTRA</b>
<b>AGUA BIDESTILADA</b>	980 µL	-	-
<b>ETANOL-AGUA (1:1)</b>	20 µL	20 µL	-
<b>MUESTRA</b>	-	-	20 µL
<b>ABTS</b>	-	980 µL	980µL
Reposar por 7 minutos alejado de la luz. Leer a 734 nm.			

Se realizó una curva de calibración del estándar Trolox<sup>®</sup> a concentraciones de 50; 100; 150 y 200 µg/mL. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Se calculó el IC50 del extracto hidroalcohólico del rizoide, del estípite, de la fronda y del estándar Trolox<sup>®</sup>.

## 4.6 Determinación de la actividad antielastasa<sup>44</sup>

### 4.6.1 Fundamento

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



Donde:

SucAla<sub>3</sub>-pNA = N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide

SucAla<sub>3</sub> = 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.

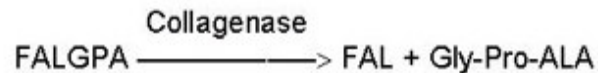
### 4.6.2 Procedimiento

Se colocó en tubo de ensayo 100 µL de buffer THAM, Sigma 7-9®, pH 8,0, luego se agregó 50 µL del extracto hidroalcohólico de rizoide de *Lessonia nigrescens* Bory (a concentraciones de 3; 5 y 8 mg/mL) y 100 µL de la enzima elastasa pancreática porcina (concentración en tubo de reacción 1 µg/mL en agua bidestilada) y se incubó durante 15 minutos a 34 °C. Luego se agregó 250 µL del sustrato N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAAPVN, concentración en tubo de reacción de 0,8 mM en buffer THAM, Sigma 7-9®, pH 8,0) y se incubó durante 11 minutos a 34 °C para que la reacción se lleve a cabo. Finalmente se añadió 1-2 gotas de ácido fórmico 10 % para detener la reacción. Se realizó la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro de luz UV-Visible a una longitud de onda de 410 nm. Además se realizó un control en donde se reemplazó la muestra por su solvente y, se trabajó con galato de epigallocatequina (EGCG) como compuesto de referencia.

## 4.7 Determinación de la actividad anticolagenasa<sup>44</sup>

### 4.7.1 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.

### 4.7.2 Procedimiento

Se colocó en tubo de ensayo 100 µL de extracto hidroalcohólico de rizoide de *Lessonia nigrescens* Bory (a concentraciones de 3; 5; 8 y 10 mg/mL) y 210 µL de la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* (solución de 1,54 unidades/mL en buffer Tris-Glicine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,5) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Luego se agregó 190 µL del sustrato N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, solución de 2,1 mM en buffer Tris-Glicine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,5) y se procedió a incubar durante 5 minutos a 37 °C para que la reacción se lleve a cabo. Finalmente se añadió 1-2 gotas de ácido fórmico 10 % para detener la reacción y se realizó la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro de luz UV-Visible a una longitud de onda de 348 nm. Además se realizó un control en donde



se reemplazó la muestra por su solvente y, se trabajó con galato de epigallocatequina (EGCG) como compuesto de referencia.

#### 4.8 Diseño de la forma dermocosmética

Se diseñó una forma dermocosmética en donde se empleó el extracto hidroalcohólico de rizoide de *Lessonia nigrescens* Bory a diversas concentraciones. Se prepararon tres cremas a las cuales se adicionó el extracto en concentraciones de 1 %, 3 % y 5 % respectivamente. Además, se elaboró una cuarta crema a la que no se le agregó extracto de rizoide (crema base).

**Tabla 4.** Formulación de la crema.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Cera Lanette SX	10 %
Oleato de decilo	20 %
Vaselina líquida	10 %
Propilenglicol	5 %
Metilparabeno	0,15 %
Propilparabeno	0,3 %
Extracto de rizoide	1 - 3 - 5 %
Agua	c.s.p.

#### 4.9 Determinación del efecto fotoprotector

##### 4.9.1 Materiales

- ◆ Crema depilatoria corporal Veet®
- ◆ Crema base
- ◆ Cremas al 1 %, 3 % y 5 % de extracto hidroalcohólico de rizoide de *Lessonia nigrescens* Bory.
- ◆ Protector solar factor 50 (crema comercial)
- ◆ Lámparas UV

**Material biológico:** el estudio farmacológico se efectuó en 30 ratones albinos machos *Mus musculus*, de un peso promedio de 25 g.

#### 4.9.2 Diseño experimental

Los ratones fueron separados en 6 grupos de 5 como se indica a continuación:

**Tabla 5.** Distribución de las muestras para la evaluación del efecto fotoprotector.

GRUPOS	MUESTRAS	Condición evaluada
N° 1: Grupo blanco	5	Sin tratamiento
N° 2: Grupo control	5	Crema base
N° 3: Grupo de intervención A	5	Crema al 1 %
N° 4: Grupo de intervención B	5	Crema al 3 %
N° 5: Grupo de intervención C	5	Crema al 5 %
N° 6: Grupo patrón	5	Crema comercial

#### 4.9.3 Procedimiento

- ◆ **Depilación:** se realizó la depilación de la parte anterior superior del lomo de los ratones con crema depiladora corporal. La depilación se realizó dos días antes de iniciar la irradiación para evitar irradiar sobre piel irritada.
- ◆ **Aplicación de la crema:** se aplicó las cremas para cada grupo respectivo (excepto el grupo el grupo blanco) de acuerdo con lo indicado en el diseño experimental. Se aplicó la crema de manera

suave con el dedo índice y se extendió uniformemente cuidando que se aplique la misma cantidad para cada ratón. Se tuvo el cuidado de limpiar el dedo de aplicación entre cada grupo de prueba. Se esperó 15 minutos a partir de la última aplicación antes de prender las lámparas UV.

- ◆ **Irradiación:** la irradiación fue llevada a cabo por 30 minutos y se registró el comportamiento de los roedores durante el proceso. Se repitió el proceso de irradiación cada 12 horas por 7 días.
- ◆ **Toma de muestras histológicas:** se realizó cortes del lomo de cada sujeto que fue expuesto a la radiación UV, procurando realizar cortes de 1 cm<sup>2</sup> sin dañar la piel. Se conservó las muestras histológicas por separado en formol neutro estabilizado.
- ◆ **Estudio histológico:** las muestras fueron preparadas y analizadas en el departamento de Patología Clínica del Hospital Arzobispo Loayza.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Extracción y rendimiento

**Tabla 6.** Porcentaje de rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de estípite, fronda y rizoide.

	Peso alga seca	Peso de extracto	% de rendimiento
<b>ESTÍPITE</b>	52 g	10,3 g	19,8 %
<b>FRONDA</b>	92 g	5,7 g	6,2 %
<b>RIZOIDE</b>	86 g	13,6 g	15,8 %

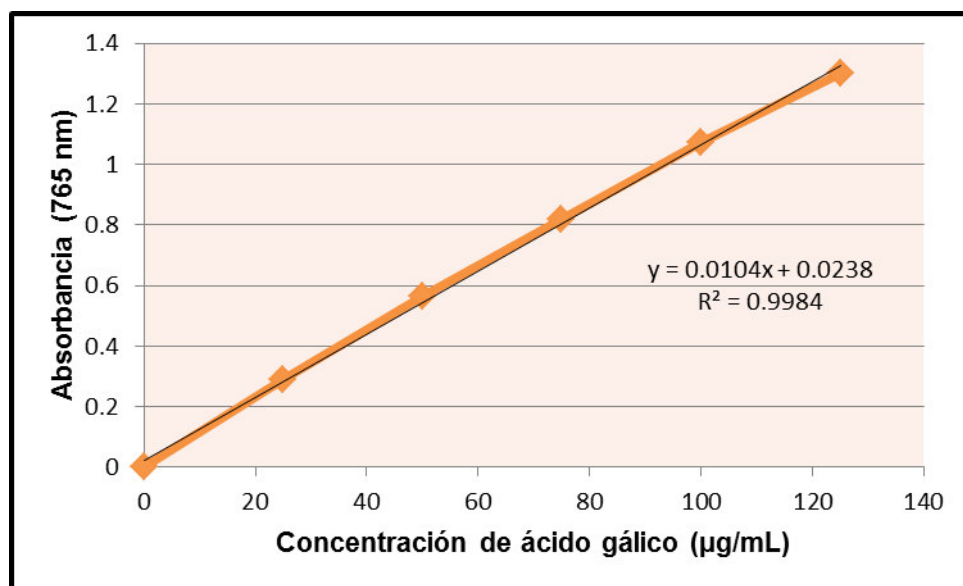
### 5.2 Marcha Fitoquímica

**Tabla 7.** Marcha Fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Lessonia nigrescens* Bory.

REACTIVO	METABOLITOS	RESULTADO		
		ESTIPITE	FRONDA	RIZOIDE
Formación de espuma	Saponinas	+	+	++
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-
Gelatina	Taninos	+	+	+
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+	+	++
Shinoda	Flavonoides	-	++	+++
Borntrager	Antraquinonas	+	++	+
Vainillina sulfúrica	Glicósidos	+	+	+
Molish	Carbohidratos	-	++	++
Lieberman - Burchard	Triterpenoides y esteroides	-	-	-

Leyenda: (+++) mayor cantidad; (++) mediana cantidad; (+) poca cantidad; (-) negativo.

### 5.3 Determinación de polifenoles totales. Método de Folin – Ciocalteu



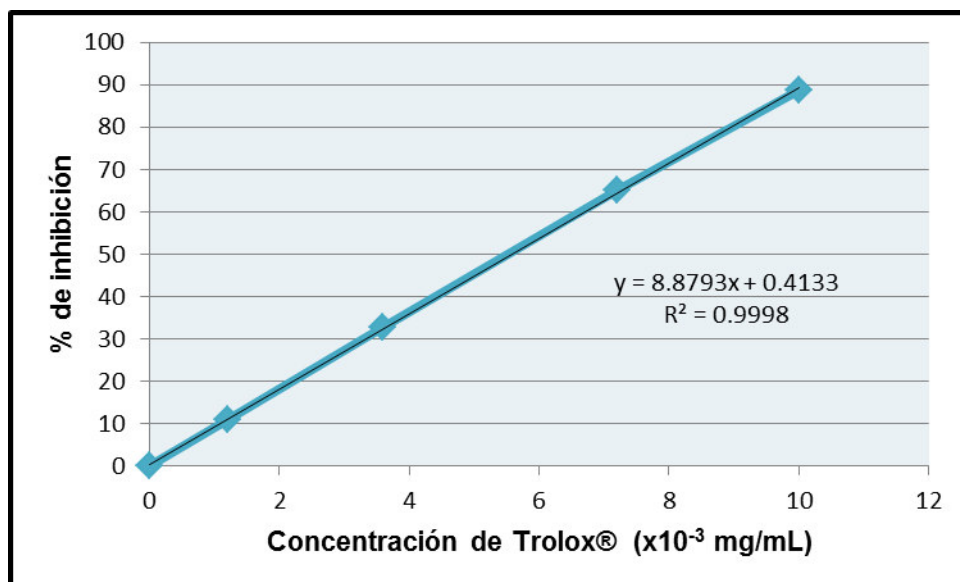
**Figura 4.** Curva de calibración del ácido gálico (estándar)

**Tabla 8.** Contenido de polifenoles totales (CPT) en los extractos de estípite, fronda y rizoide.

Parte del alga	CPT (mg de equivalentes de ácido gálico/g de alga seca)
Estípite	0,454
Fronda	0,604
Rizoide	0,629

## 5.4 Determinación de la actividad antioxidante

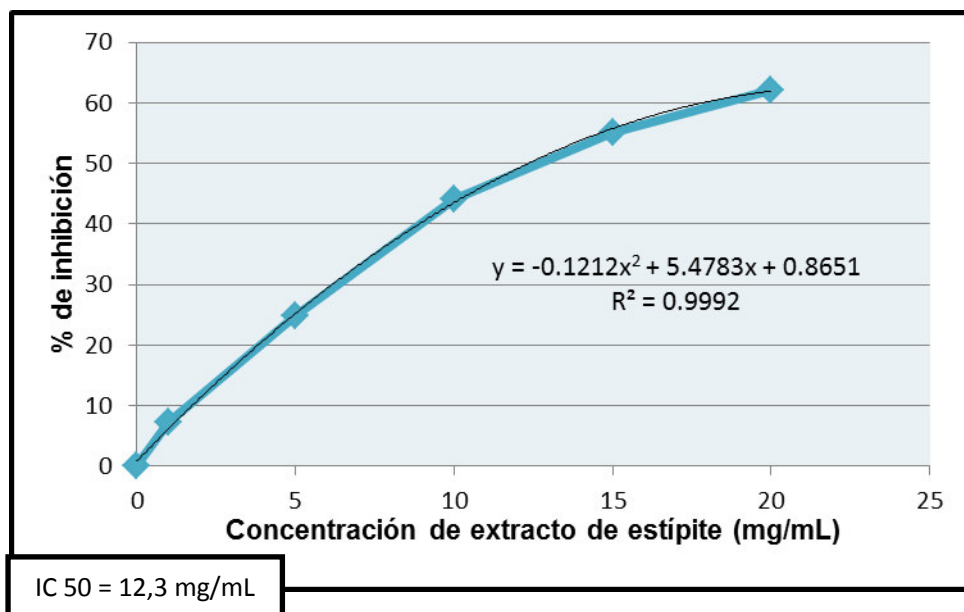
### 5.4.1 Método de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)



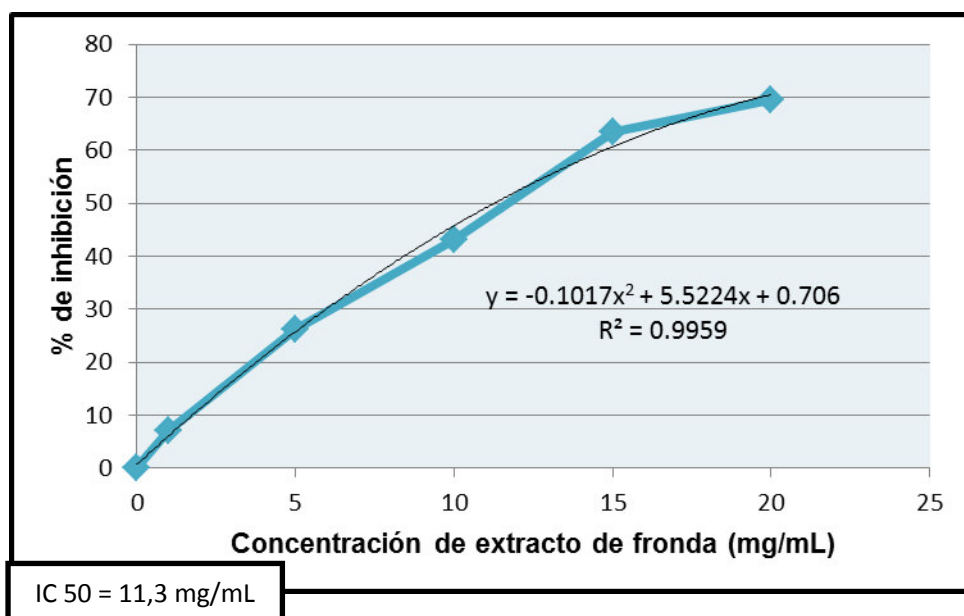
**Figura 5.** Curva de captación de DPPH del estándar Trolox®

**Tabla 9.** Porcentaje de inhibición de DPPH del estándar Trolox®

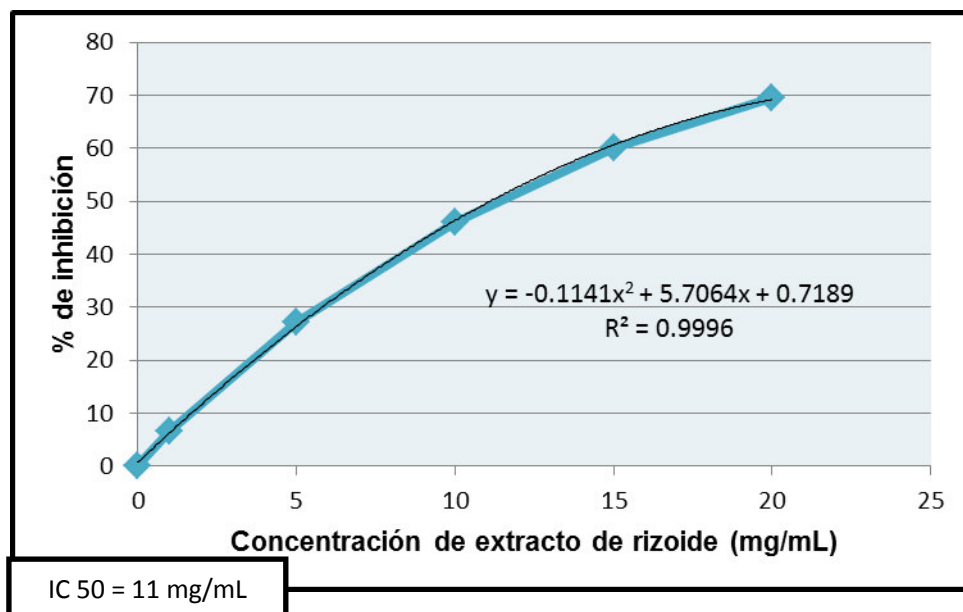
Concentración de Trolox® (x10 <sup>-3</sup> mg/mL)	% de Inhibición
1,2	11,01
3,6	32,81
7,2	65,04
10	88,56
IC 50 = 5,6 x 10 <sup>-3</sup> mg/mL	



**Figura 6.** Curva de captación de DPPH del extracto hidroalcohólico de eucalipto.



**Figura 7.** Curva de captación de DPPH del extracto hidroalcohólico de rama.



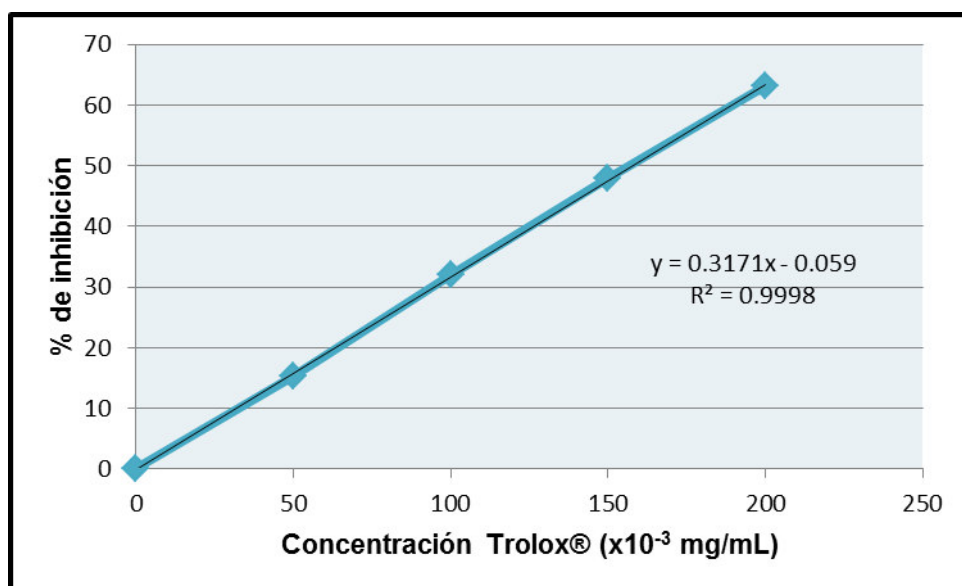
**Figura 8.** Curva de captación de DPPH del extracto hidroalcohólico de rizoide.

**Tabla 10.** Porcentaje de inhibición de DPPH de los extractos hidroalcohólicos de estípite, fronda y rizoide.

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición		
	Estípite	Fronda	Rizoide
1	7,26	7,13	6,74
5	24,94	26,27	27,15
10	44,04	43,16	46,16
15	55,09	63,39	60,06
20	62,19	69,58	69,53
IC 50	12,3 mg/mL	11,3 mg/mL	11 mg/mL



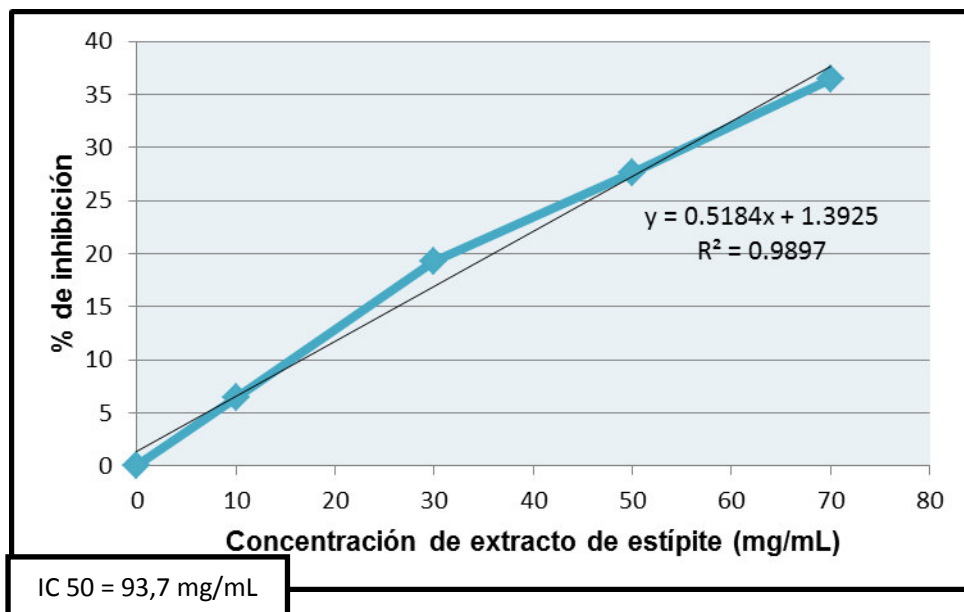
### 5.4.2 Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)



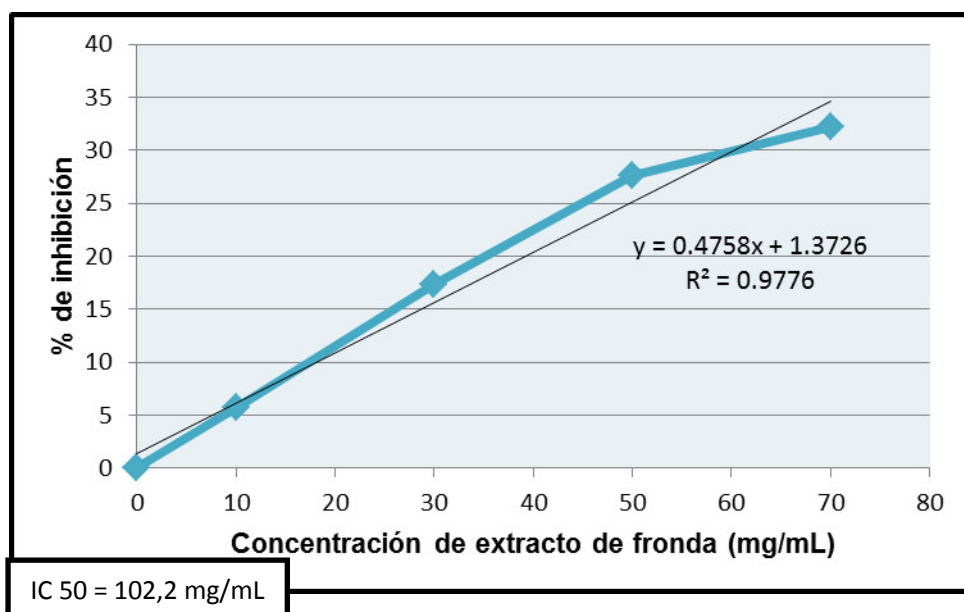
**Figura 9.** Curva de captación de ABTS<sup>•+</sup> del estándar Trolox®

**Tabla 11.** Porcentaje de inhibición de ABTS<sup>•+</sup> del estándar Trolox®

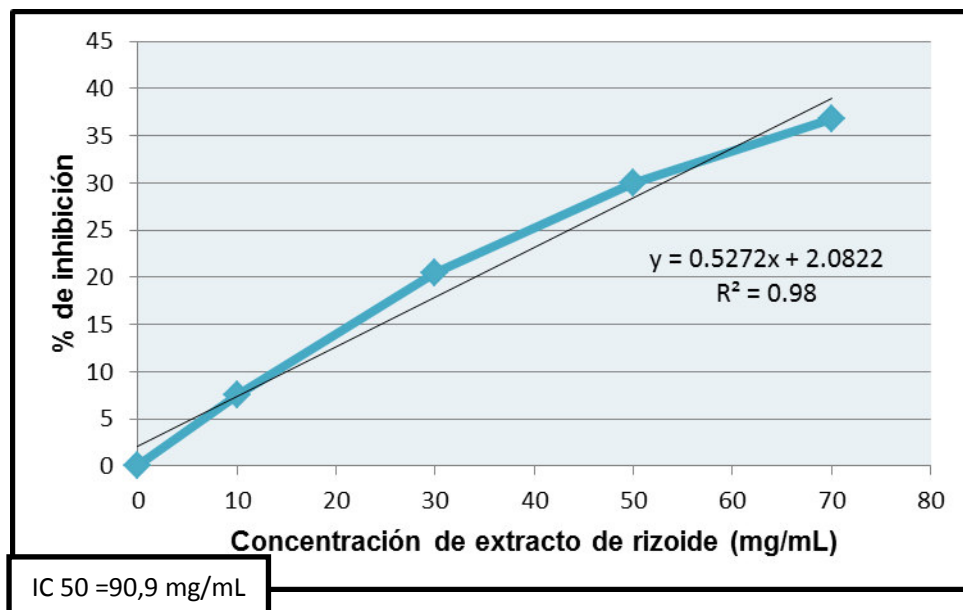
Concentración de Trolox® (x10 <sup>-3</sup> mg/mL)	% de Inhibición
50	15,38
100	31,99
150	47,81
200	63,05
IC 50 = 154,33 x 10 <sup>-3</sup> mg/mL	



**Figura 10.** Curva de captación de ABTS\*<sup>+</sup> del extracto hidroalcohólico de estípite.



**Figura 11.** Curva de captación de ABTS\*<sup>+</sup> del extracto hidroalcohólico de fronda.

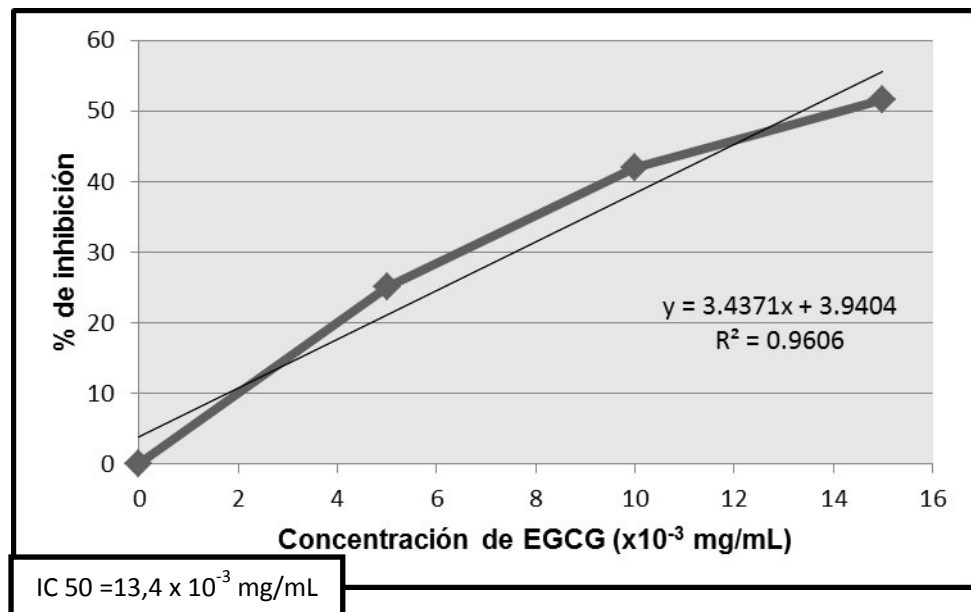


**Figura 12.** Curva de captación de ABTS<sup>•+</sup> del extracto hidroalcohólico de rizoide.

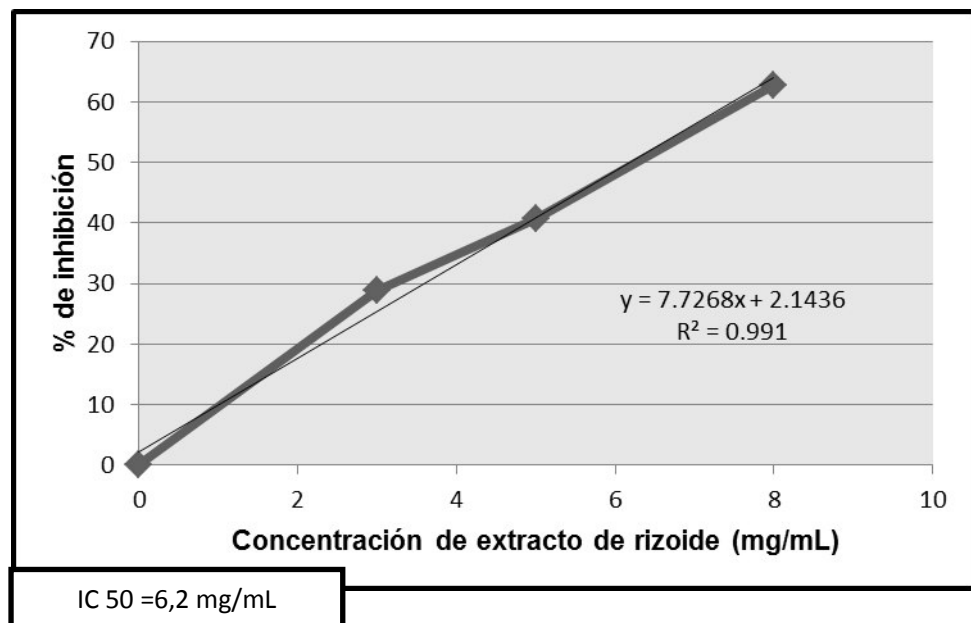
**Tabla 12.** Porcentaje de inhibición de ABTS<sup>•+</sup> de los extractos hidroalcohólicos de estípite, fronda y rizoide.

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición		
	Estípite	Fronda	Rizoide
10	6,52	5,77	7,53
30	19,33	17,36	20,50
50	27,59	27,63	29,99
70	36,46	32,24	36,74
IC 50	93,7 mg/mL	102,2 mg /mL	90,9 mg/mL

## 5.5 Determinación de la actividad antielastasa



**Figura 13.** Curva de inhibición de elastasa del estándar galato de epigalocatequina (EGCG)

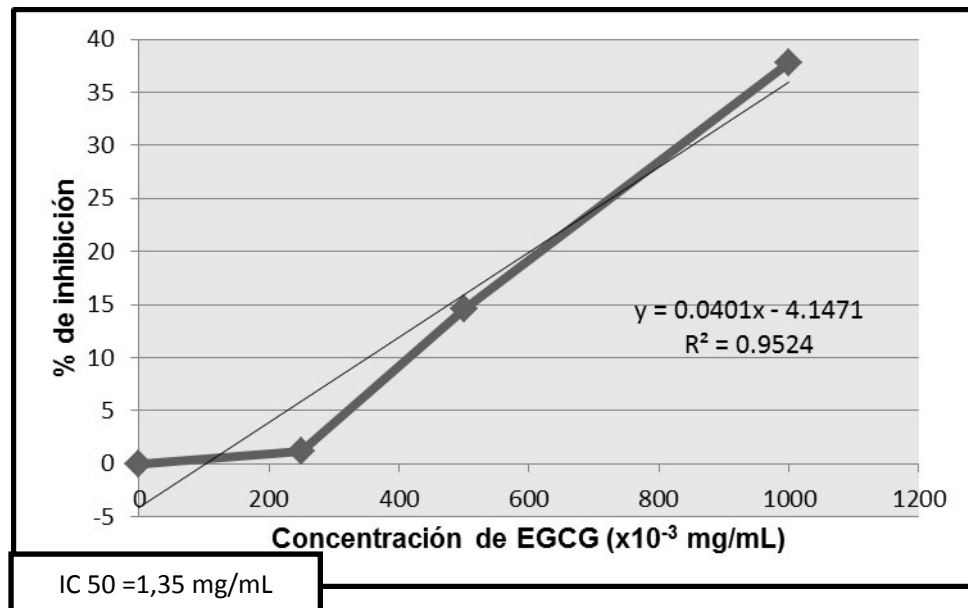


**Figura 14.** Curva de inhibición de elastasa del extracto hidroalcohólico de rizoide

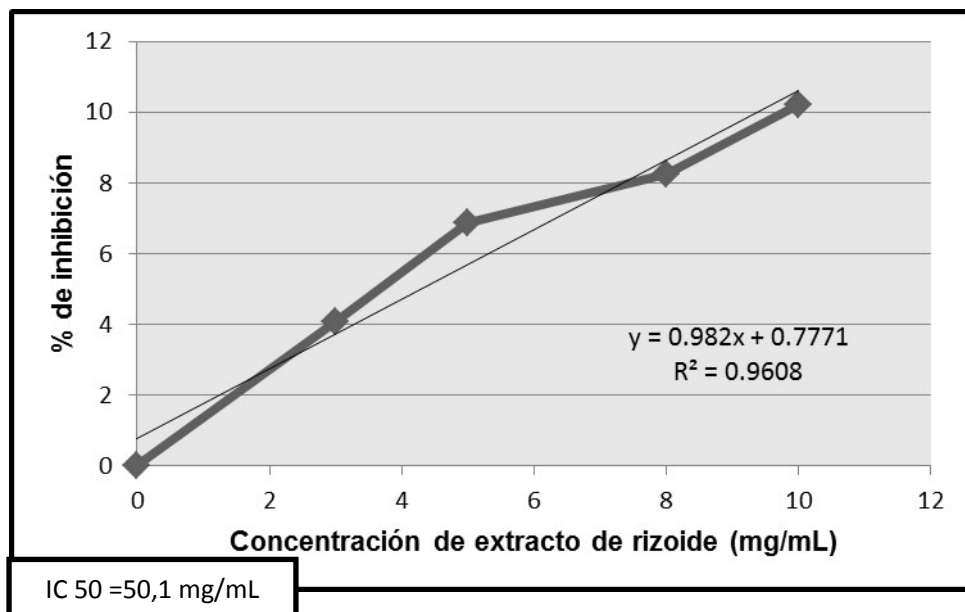
**Tabla 13.** Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa del estándar galato de epigalocatequina (EGCG) y del extracto hidroalcohólico de rizoide.

EGCG		RIZOIDE	
Concentración (x10 <sup>-3</sup> mg/mL)	% de Inhibición	Concentración (mg/mL)	% de Inhibición
5	25,2	3	28,8
10	42,1	5	40,7
15	51,7	8	62,7
IC 50 = 13,4 x 10 <sup>-3</sup> mg/mL		IC 50 = 6,2 mg/mL	

### 5.6 Determinación de la actividad anticolagenasa



**Figura 15.** Curva de inhibición de colagenasa del estándar galato de epigalocatequina (EGCG)



**Figura 16.** Curva de inhibición de collagenasa del extracto hidroalcohólico de rizoide

**Tabla 14.** Porcentaje de inhibición de la enzima collagenasa del estándar galato de epigalocatequina (EGCG) y del extracto hidroalcohólico de rizoide.

EGCG		RIZOIDE	
Concentración (mg/mL)	% de Inhibición	Concentración (mg/mL)	% de Inhibición
0,25	1,2	3	4,1
0,5	14,6	5	6,9
1	37,8	8	8,2
-	-	10	10,2
IC 50 = 1,35 mg/mL		IC 50 = 50,1 mg/mL	

## 5.7 Diseño de la forma dermocosmética

A partir de la formulación desarrollada se prepararon cremas de tipo agua en aceite (w/o) con los siguientes resultados:

### ■ Crema base

Aspecto: suave al tacto, fluido, ligeramente oleoso (tolerable), de color blanco.

### ■ Crema al 1 %

Aspecto: oleoso, suave al tacto, de color blanquecino con cierta opacidad correspondiente al extracto. Homogéneo.

### ■ Crema al 3 %

Aspecto: oleoso, suave al tacto, fluido, de color marrón suave.

### ■ Crema al 5 %

Aspecto: muy suave al tacto, muy fluido, más oleoso que las cremas anteriores, de color marrón.

## 5.8 Determinación del efecto fotoprotector

El análisis histopatológico del efecto fotoprotector se realizó con el estudio del tejido del lomo anterior superior del ratón, al que se realizó la aplicación tópica de la forma dermocosmética. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 15 y los cortes histológicos se observan en los anexos F – E<sup>1</sup>.

**Tabla 15.** Descripción del análisis histopatológico para la determinación del efecto fotoprotector.

<b>N° DE GRUPO</b>	<b>ANÁLISIS MACROSCÓPICO</b>	<b>ANÁLISIS MICROSCÓPICO</b>
N° 1: Grupo blanco	Piel deshidratada, arrugada , áspera	Epidermis delgada. Capa Córnea laminar o ausente. Ausencia de tejido conectivo laxo. Presencia de tejido conectivo denso.
N° 2: Grupo control (crema base)	Piel deshidratada, arrugada y áspera.	Epidermis delgada. Capa córnea laminar o ausente.  Ausencia de tejido conectivo laxo. Presencia de tejido conectivo denso.
N° 3: Grupo de intervención A (crema al 1%)	Piel deshidratada, arrugada, eritematosa.	Epidermis delgada con tejido de granulación. Capa córnea laminar, con solución de continuidad. Dermis gruesa con fibras densas.
N° 4: Grupo de intervención B (crema al 3%)	Piel deshidratada, arrugada, eritematosa.	Capa córnea discontinua, epidermis engrosada, tejido de granulación, con presencia de tejido conectivo denso. Presencia de ampolla en lámina 19.
N° 5: Grupo de intervención C (crema al 5%)	Piel arrugada, deshidratada,	Capa córnea laminar, ausente o escasa, epidermis delgada con solución de continuidad, dermis acantótica, con tejido conjuntivo denso.
N° 6: Grupo patrón (protector solar comercial)	Piel deshidratada, arrugada.	Capa córnea laminar densa, epidermis tejido estratificado, dermis engrosada con tejido colágeno denso y compacto, presencia de fibroblastos



## VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la determinación de polifenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu mostraron que el rizoide es la parte del alga *Lessonia nigrescens* Bory con mayor cantidad de polifenoles (0,629 mg de EAG/g de alga seca). Por medio del análisis estadístico ANOVA y Tukey se determinó que existe diferencia significativa entre los valores de polifenoles obtenidos en cada uno de los extractos con un intervalo de confianza al 95 %.

La cantidad de polifenoles en todo el alga es de 1,687 mg de EAG/g de alga seca. Se observa que la concentración de polifenoles es comparable con los estudios del alga *Sargassum muticum* (0,7895 ± 0,0433 mg de EAG/g de planta seca)<sup>50</sup>. Sin embargo, este valor es menor comparado con los resultados obtenidos en el estudio de las algas *Turbinaria conoides* (16,64 mg de EAG/g) y *Turbinaria ornata* (3,42 mg de EAG/g)<sup>51</sup>. En el estudio de las algas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile* se obtuvo una concentración de 74,25 ± 2,61 mg polifenoles/g alga seca y 66,72 ± 6,41 mg polifenoles/g alga seca respectivamente<sup>8</sup>. En este caso es necesario precisar que se trabajó con la técnica de Swain y Hillis sobre una extracción con tetrahidrofurano, lo cual difiere de nuestro estudio. Por otro lado, se debe considerar que las algas mencionadas suelen crecer en climas tropicales donde la temperatura es mayor mientras que el alga parda estudiada tiene un mejor crecimiento en zonas de agua fría, lo que podría explicar la diferencia en la concentración de polifenoles<sup>52</sup>.

La actividad antioxidante fue evaluada mediante dos métodos: captación del radical DPPH y captación del radical ABTS<sup>•+</sup>. En el ensayo con DPPH se obtuvo un IC50 = 12,3 mg/mL para el extracto de estípite, un IC50 = 11,3 mg/mL para el extracto de fronda y un IC50 = 11 mg/mL para el extracto de rizoide, mientras que el estándar Trolox® presentó un IC50 = 5,6x10<sup>-3</sup> mg/mL. En el ensayo con ABTS<sup>•+</sup> se obtuvo un IC50 = 93,7 mg/mL para el extracto de estípite, un IC50 = 102,2 mg/mL para el extracto de fronda y un IC50 = 90,9 mg/mL para el extracto de rizoide, mientras que el estándar Trolox® tuvo un IC50 = 154,33x10<sup>-3</sup> mg/mL. Estos resultados muestran que los extractos

hidroalcohólicos de estípide, fronda y rizoide poseen actividad antioxidante y que de los tres es el extracto de rizoide el que destaca, lo cual concuerda con lo obtenido en el ensayo de determinación de polifenoles. Por otro lado, ambos métodos ponen en evidencia que la actividad antioxidante de *Lessonia nigrescens* Bory no es considerable en comparación con el compuesto de referencia Trolox®.

No se reportan otros ensayos afines para el alga *Lessonia nigrescens* Bory; pero existen investigaciones sobre la actividad antioxidante de otro tipo de algas. Por ejemplo en el estudio de las algas *Cystoseira indica* y *Cystoseira merica* se determinó la actividad antioxidante por el método de captación del radical DPPH, obteniéndose como resultado un IC50 de 45 µg/mL y 67 µg/mL respectivamente<sup>53</sup>. Por otro lado, en un estudio del alga parda *Macrocystis integrifolia* Bory se obtuvo que el extracto hidroalcohólico de fronda presentó actividad antioxidante frente al radical ABTS con un IC50 = 173,21 µg/mL<sup>54</sup>.

De acuerdo a lo anterior se propone que la actividad antioxidante estaría relacionada a la concentración de polifenoles en las especies mencionadas. Según la bibliografía consultada, la actividad antioxidante se encuentra ligada al tipo de compuesto polifenólico que predomina en la especie vegetal. Los compuestos fenólicos de mayor peso molecular y cantidad de grupos oxidrilos, por ejemplo los taninos, poseerían mayor capacidad de capturar radicales libres<sup>5,47</sup>.

En la actualidad la actividad antielastasa y anticlagenasa se viene estudiando en diversas especies vegetales con el propósito de encontrar nuevas fuentes naturales para la prevención y tratamiento del fotoenvejecimiento. La proteína elastina está presente en el tejido conectivo de la piel y los pulmones y es catalizada por la enzima elastasa. La degradación de la elastina por la elastasa intracelular se incrementa con la edad y/o con la repetida exposición a la radiación UV, llevando al envejecimiento de la piel<sup>55</sup>. Por otra parte, el colágeno es la mayor proteína estructural de la matriz extracelular de la piel y es degradada por las metaloproteinasas de la matriz (MMP), entre las cuales se encuentra la enzima colagenasa. Después de la exposición a grandes dosis de

radiación UV se forman grandes cantidades de MMPs, lo que reduce la producción de colágeno. El envejecimiento de la piel es consecuencia de una matriz de colágeno fragmentada por los MMPs<sup>55,56</sup>.

Las pruebas antielastasa y anticlagenasa se realizaron con el extracto hidroalcohólico de rizoide, debido a que este presentó mayor concentración de polifenoles respecto a los extractos de estípita y fronda. En la determinación de la actividad antielastasa se obtuvo un IC50 = 13,4 µg/mL para el EGCG y un IC50 = 6,2 x10<sup>3</sup> µg/mL para el extracto hidroalcohólico de rizoide. En estudios realizados con extracto de tara se observa una actividad antielastasa (IC50 >250 µg/mL) menor a la registrada para el estándar EGCG (IC50 = 10,3 µg/mL). Este resultado supondría que el extracto de tara presenta una mayor actividad anti elastasa que el extracto hidroalcohólico de rizoide lo que podría relacionarse con la presencia de una mayor cantidad de polifenoles en la tara (29,5 ± 0,11 mg de ácido gálico/1g de extracto)<sup>57</sup>.

Del mismo modo, en la determinación de la actividad anticlagenasa se obtuvo un IC50 = 1350 µg/mL para el EGCG y un IC50 = 50,1 mg/mL (50,1 x10<sup>3</sup> µg/mL) para el extracto hidroalcohólico de rizoide. En el estudio revisado donde se realiza la determinación de la actividad anticlagenasa del extracto de tara, se evidencia una mayor actividad (IC50 = 162,8 µg/mL) respecto al estándar de referencia EGCG (IC50 = 321,4 µg/mL)<sup>57</sup>. En la investigación realizada a los extractos de *Bixa orellana* (achiote) y *Oenothera rosea* (chupasangre) se observó una alta inhibición de la enzima colagenasa (IC50 = 166,23 y 194,89 µg/mL, respectivamente). Este resultado podría estar relacionado a la concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos de *Bixa orellana* (14,9 ± 0,03 mg de ácido gálico/g de extracto) y *Oenothera rosea* (15,4 ± 0,04 mg de ácido gálico/g de extracto)<sup>58</sup>. Por lo tanto, se estaría demostrando que el extracto de rizoide presentaría un bajo potencial de inhibición de la enzima colagenasa respecto a las especies mencionadas.

Conforme a ciertos estudios algunos compuestos fenólicos tienen la capacidad de formar precipitados con iones metálicos como el zinc, el cual es un componente del centro activo de la colagenasa. Se ha reportado que los

taninos poseen actividad quelante por la cual al formarse un precipitado con el zinc se impide la unión de la enzima colagenasa con su sustrato<sup>59</sup>. Teniendo en cuenta los resultados de la marcha fitoquímica realizada a los extractos de estípite, fronda y rizoide se podría afirmar que el bajo potencial de actividad antielastasa es debido a la poca concentración de taninos; no obstante se debería realizar un análisis más exhaustivo al respecto.

De acuerdo con los resultados macroscópicos de la piel después del periodo de 7 días de irradiación se pudo observar que todos los grupos irradiados mostraron una notable deshidratación y piel arrugada. La exposición a radiación UV resulta en lesiones de la piel como hiperpigmentación, arrugas, envejecimiento, daño por acción de luz, etc<sup>60</sup>. La acantosis y la hiperqueratosis, entre otros factores, impiden el paso del agua transepidérmica. El déficit de agua va dando a la piel una apariencia seca, arrugada y escamosa<sup>61</sup>.

En los resultados histológicos se puede apreciar la capa córnea ausente o en forma laminar en los grupos control y blanco. Esto sugiere que las lesiones se generan al no recibir protección alguna, absorbiendo la irradiación directamente. Asimismo, se observa una respuesta a nivel de la dermis en las fibras colágenas. Histológicamente, el fotoenvejecimiento está caracterizado por la elastosis de la dermis debido a un proceso degenerativo de la fibra elástica propio del daño por luz UV. La ausencia de súper óxido dismutasas de la dermis permite que la luz UV genere radicales libres que dañan directamente fibras elásticas y colágenas y la matriz extracelular dérmica<sup>62</sup>.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio del efecto antienvjecimiento del gel de Vimang (*Mangifera indica* L.) en donde la piel de los ratones del grupo control y blanco se observaron daños considerables, con arrugamiento visible del lomo y congestión de las orejas, eritema, acantosis e hiperqueratosis. La dermis presentó desorganización y destrucción de las fibras colágenas e incremento de las fibras elásticas<sup>63</sup>.

De acuerdo al estudio realizado del alga parda *Macrocystis integrifolia* Bory, se demostró que su extracto vehiculizado en una forma dermocosmética podría tener efecto antifotoenvejecimiento *in vivo*. Esto fue determinado en ratones depilados a los cuales se irradió luz UV posterior a la aplicación de las cremas<sup>54</sup>. De una forma similiar al estudio mencionado, en los resultados histológicos de los grupos de intervención con cremas al 3 %, 5 % y crema comercial, se apreció la existencia de una respuesta de la piel traducida en aumento del grosor de la dermis (acantosis) lo que sugiere un posible efecto fotoprotector *in vivo* del extracto hidroalcohólico de rizoide evaluado.

Según diversas investigaciones se considera que la posible actividad antifotoenvejecimiento de los extractos de algas marinas, y en general de otras especies vegetales, está relacionada a su concentración de polifenoles y su respectiva actividad antioxidante<sup>54,55,58,64,65</sup>.

## VII. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico del alga parda *Lessonia nigrescens* Bory contiene polifenoles; siendo el rizoide la parte del alga que contiene la mayor concentración de los mismos igual a 0,629 µg de EAG/mg de extracto.
2. Los métodos antioxidantes *in vitro* DPPH y ABTS<sup>•+</sup> demostraron que el rizoide es la parte del alga que presenta mayor actividad antioxidante, con un IC50 = 11 x10<sup>3</sup> mg/mL y IC50 = 90,9 mg/mL para cada método.
3. En el análisis enzimático, el extracto hidroalcohólico de rizoide presentó actividad antielastasa con un IC50 = 6,2 mg/mL.
4. En el análisis enzimático, el extracto hidroalcohólico de rizoide presentó actividad anticlagenasa con un IC50 = 50,1 mg/mL.
5. Las cremas preparadas en base al extracto hidroalcohólico de rizoide demostraron ser estables luego de la adición del extracto a sus diferentes concentraciones.
6. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de rizoide presentó un efecto fotoprotector comparable a una crema comercial FPS 50.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda profundizar en el estudio de la composición química del alga, para determinar cuáles son las moléculas responsables de la actividad antioxidante.
2. En la determinación de la actividad inhibitoria de las enzimas elastasa y colagenasa se sugiere probar un método en el que se pueda tener un control constante de la temperatura, con la finalidad de asegurar la estabilidad de los reactivos biológicos.
3. Se debe continuar con el estudio de esta especie de alga marina porque representa un recurso natural que puede ser aprovechado por las comunidades almeras del litoral peruano.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Batista González A, Charles MB, *et al.* Las algas marinas como fuente de fitofármacos antioxidantes. Rev Cubana Plant Med. [Revista en línea][Citado 13 Abril 2015] 2009; 14(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-7962009000200009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-7962009000200009)
2. Copia J, Gaete H, Zúñiga G, Hidalgo M, Cabrera E. Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella sp.* Lat. Am. J. Aquat. Res.2012; 40(1): 113-23.
3. Vázquez Roncero A, Janer del Valle C, Janer del Valle ML. Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva. Grasas y Aceites. 1976; 37: 350-57.
4. Kinsella J, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food Technology. 1993; 85-89.
5. Paladino S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera l.*). [Tesis de maestría]. Argentina: Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias, 2012.
6. Tomás-Barberán F.A. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alim, Nutri, Salud. 2003; 10(2): 41-53.
7. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr Hosp. 2012; 27(1): 76-89.
8. Vidal A, Silva de Andrade-Wartha E., *et al.* Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. Ars Pharm. 2009; 50(1): 24-31.
9. Mejía Giraldo JC, Atehortúa L, Puertas Mejía MÁ. Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. Dermatología Cosmética Médica y Quirúrgica. 2014; 12(4): 272-81.



10. Castro A. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxyllum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis de doctorado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2008.
11. Gilaberte Y, Coscojuela C. Fotoprotección. *Actas Dermosifiliogr.* 2003; 94(5): 271-93.
12. Gobierno de Chile. Cierre Registro Pesquero Artesanal: Huiro negro (*Lessonia nigrescens*), Huiro palo (*Lessonia trabeculata*) y Huiro (*Macrocystis spp.*) IV Región de Coquimbo. Unidad de Recursos Bentónicos: Departamento de Pesquerías; Febrero 2009. (Informe técnico R.Pesq. N°019/2009).
13. Acleto C, Zúñiga R. Introducción a las algas. Lima - Perú. Edit. Escuela Nueva. 1998. 383 pp.
14. Scrosati R. Estudio anatómico de *Lessonia nigrescens* (phaeophyceae laminariales) de Chile. *Darwiniana.* 1993; 32(1-4):271-78.
15. Kuklinski C. Farmacognosia. Barcelona. Ediciones Omega S.A. 2003.
16. Peso-Echarri P, Frontela-Saseta C. *et al.* Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. *Rev Biol Marina y Oceanografía.* 2012; 47(3): 373-81.
17. Rozo G, Gómez D, Rozo C. Efecto de una biopelícula de alginato en la conservación de cebolla larga (*Allium fistulosum* L.). *Vitae.* 2016; 23(1): 419-23.
18. Lupo Pasin B, González Azón C, Maestro Garriga A. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Rev. Venez. Cienc. Technol. Aliment.* 2012; 3(1):130-51.
19. Castillo Rojas R, Tejada Cáceres A, Castañeda Muñoz V, Pastor Cuba, R. Diagnóstico y estado de la macroalga parda aracanto *Lessonia nigrescens* en el litoral de Arequipa, Perú 2007. Instituto del mar del Perú. Informe. Octubre-Diciembre 2011; 38(4): 429-40.

20. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.
21. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J*. [Revista en línea] [Citado 4 Set 2016]; 15(71). Disponible en: <https://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12937-016-0186-5>
22. Diego Camps, *et al.* Bioquímica del estrés oxidativo. [Libro electrónico] 1ra ed. Argentina: Universidad Católica de Córdoba; 2010 [Citado 9 Mayo 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.pe/books?id=QcELAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=QcELAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
23. Tegeli V. *et al.* Importance of Free Radical and Antioxidant on Human Health. *IJPCBS* 2014;4(4):1038-50
24. Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination [Libro electrónico]. Buenos Aires: INTECH; 2012 [Citado 10 Oct 2016]. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/38477.pdf>
25. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89-96.
26. Venereo JR. Daño oxidativo, Radicales libre y Antioxidante. *Rev Cubana Med Milit*. 2002;31(2):126-33
27. Palomino Yamamoto M. Fisiología de la piel. *Revista Peruana de Dermatología*. [Revista en línea][Citado 30 Abr 2016] 2001; 11(2). Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v11\\_n2/fisio\\_piel.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v11_n2/fisio_piel.htm).
28. Navarrete Franco G. Histología de la piel. *Rev Fac Med UNAM*. 2003; 46(4): 130-33.
29. Moore KL, Dalley II AF. Anatomía con orientación clínica. 5 ed. México D.F. Editorial Médica Panamericana; 2008.

30. Romero Bustos V. Escala para valoración clínica de fotoenvejecimiento cutáneo en la cara. [Tesis de grado en línea] Grupo de investigación clínica. Argentina: Universidad del Rosario, Facultad de Medicina; 2014 [Citado 30 Abr 2016]. Disponible en: <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/8867/93413704.pdf?sequence=1>
31. Barco D, Roé E, García-Navarro X. *et al.* Envejecimiento cutáneo: prevención y tratamiento. *Farmacia Profesional*. 2007; 21(3): 64-68.
32. Cosalvo L, Dabhar M, Santisteban M, Stengel F. Envejecimiento cutáneo. *Arch Argent Dermatol*. 2006; 56:1-15.
33. Díaz de Villegas Álvarez E, Castillo Menéndez M, Sabatés Martínez M, *et al.* Radiación ultravioleta. Fotoenvejecimiento cutáneo. *Medisur* [en línea][Citado 15 Mayo 2016] 2005; 3(1): 314-333. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180020172002>.
34. Calero Romero O, Quezada Rojas G, Ramírez Rojas M. *et al.* Envejecimiento prematuro de la piel. *Universitas*. 2009; 3(1): 30-33.
35. Mora Ochoa M, Olivares Savigñon A, González Gross T, Castro Mela I. El sol: ¿enemigo de nuestra piel? *Medisan*. 2010; 14(6): 825-37.
36. Magliano J, Álvarez M, Salmentón M, Larre Borges A, Martínez M. Fotoprotección en los niños. *Arch Pediatr Urug*. 2011; 82(2): 96-103.
37. Valdivielso-Ramos M, Herranz J.M. Actualización en fotoprotección infantil. *An Pediatr (Barc)*. 2010; 72(4): 282.e1-9.
38. Morales-Molina J, Jiménez-Martín J. *et al.* Quemaduras solares: fotoprotección y tratamiento. *Ars Pharm*. 2006; 47(2): 119-35.
39. Wang S, Balagula Y, Osterwalder U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. *Dermatologic Therapy*. 2010; 23: 31-47.
40. Reena R, Shanmuga Sekar C, Srinivas CR. Update on Photoprotection. *Indian Journal of Dermatology*. 2012; 57(5): 335-42.

41. 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.
42. 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.
43. Suárez S. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum* var. huaralino (ajo) en modelos *in vitro*. [Tesis de doctorado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2014.
44. 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. doi: 10.1186/1472-6882-9-27
45. Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas. 2005; 25(4): 726-32.
46. Boncún León B, Ruiz Reyes S *et al.* Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos e hidroetanólicos de las hojas de *Cynara scolymus* L. “alcachofa” frente al 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo. Pharmaciencia. [Revista en línea][Citado 25 Jun 2015] 2013; 1(1). Disponible en: <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/169>
47. Brglez Mojzer E, Knez M, Skerget M, Knez Z, Bren U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. Molecules [en línea][Citado 13 Sep 2016] 2016; 21(7). doi: 10.3390/molecules21070901
48. Alonso Vega J.M. Fauna asociada a discos de adhesión del complejo *Lessonia nigrescens*. ¿Es un indicador de integridad ecológica en praderas explotadas de huiro negro, en el norte de Chile? Lat Am J Aquat Res. 2016; 44(3): 623-37.

49. Gómez I, Ulloa N, Orostegui M. Morpho-functional patterns of photosynthesis and UV sensitivity in the kelp *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyta). *Marine Biology*. 2005; 148: 231-40.
50. Namvar F, Mohamad R, Baharara J, Zafar-Balanejad S, Fargahi F, Rahman H. Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*) *BioMed Research International*. [en línea] [Citado 13 Sep 2016] 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/604787>
51. Chakraborty K, Praveen N, Vijayan K, Rao G. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria spp.* (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar Kadal. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3(1): 8-16.
52. Bandeira-Pedrosa M, Pereira S, Oliveira E. Taxonomy and distribution of the Green algal genus *Halimeda* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil. *Revista Brasil. Bot.* 2004; 27(2): 363-77
53. Yegdaneh A, Ghannadi A, Dayani L. Chemical constituents and biological activities of two Iranian *Cystoseira* species. *Res Pharm Sci*. 2016; 11(4): 311-17.
54. Castro AJ, Juárez JR, Suárez S, *et al.* Efecto antioxidante y antifotoenvejecimiento de extractos de la macroalga del litoral peruano *Macrocystis integrifolia* Bory y elaboración de una forma dermocosmética. *Ciencia e Investigación. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM*. 2014; 17(2): 80-87.
55. Ndlovu G, Fouche G, Tselanyane M, Cordier W, Steenkamp V. *In vitro* determination of the anti-aging potencial of four southern African medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 13: 304-10.
56. Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, Szeimies R. Sking ageing. *J EADV* 2011; 25: 873–84.
57. Doroteo VH, *et al.* Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticlagenasa y fotoprotectora *in vitro* de *Myrciaria dubia*

- (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). Rev. Soc. Quím. 2012; 78(4): 254-63.
58. Rojas R, Doroteo VH, *et al.* Actividad antioxidante, Anti-elastasa, Anti-colagenasa, protectora contra rayos UV-B, promotora de síntesis de colágeno *in vitro* y estudios de seguridad/eficacia de extractos de *Bixa orellana* (Achiote) y *Oenothera rosea* (Chupasangre). En XXI Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos. São Paulo, Brasil. 14-16 Mayo del 2013. Boletín virtual de la Asociación Peruana de Química Cosmética. [en línea] [Citado 20 Dic 2016] 2013. Disponible en: <http://apqc.org.pe/boletines/ago-13/articulo02.html>
59. Kim Y., Uyama H., Kobayashi S. Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. Biochem Biophys Res Commun 2004; 320: 256-61.
60. Roy A *et al.* *In vitro* techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. Pharmacogn Rev. 2013; 7(14): 97–106.
61. Goldemberg RL. Functional aging. Drug and Cosmetic Industry. 1995; 7: 68-71.
62. Honeyman J. Efectos de las radiaciones ultravioleta en la piel. Revista Peruana de Dermatología. [Revista en línea] [Citado 10 Oct 2016] 2002; 12(2). Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v12\\_n2/efectos\\_radiaciones.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v12_n2/efectos_radiaciones.htm)
63. Concepción A, De la Peña R, Farillas L. Gel de Vimang con actividad antifotoenvejecimiento: estudio histopatológico preliminar. Rev Cubana Invent Biomed. 2003; 22(1): 68-70.
64. Concepción AR, *et al.* Evaluación de Extractos de Algas Marinas, con Actividad Antioxidante y Reorganizadora de la Fibra Colágena. Rev Cubana Invest Biomed. 2001; 20(1):6-11.
65. Guzmán M, Cortázar T. Inhibición de las actividades Colagenasa y Elastasa en Fibroblastos Humanos Estimulados con UVB. Cosméticos & Tecnología Latinoamérica. 2011 Marzo-Abril; 2: 19-23.

## X. ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

### CONSTANCIA N° 61-USM-2013

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

La muestra vegetal (Algas), recibida de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Lessonia nigrescens*** Bory de Saint-Vincent.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2013:

**DIVISION: PHAEOPHYTA**

**CLASE: PHAEOPHYCEAE**

**ORDEN: LAMINARIALES**

**FAMILIA: LESSONIACEAE**

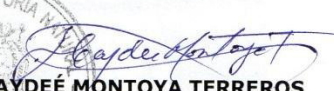
**GENERO: *Lessonia***

**ESPECIE: *Lessonia nigrescens* Bory de Saint-Vincent**

Determinado por: Blgo. Mario Benavente.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 02 de abril de 2013

  
**Dra. HAYDEÉ MONTOYA TERREROS**  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

### Anexo A. Clasificación taxonómica

**Anexo B.** Análisis estadístico de la determinación de polifenoles totales.

◆ Análisis de varianza (ANOVA):

Hipótesis nula: Todas las medias son iguales.

Hipótesis alterna: Por lo menos una media es diferente.

Nivel de significancia:  $\alpha = 0.05 \%$

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor F teórico
Factor	2	0,0139	0,00695	53,46	9,55
Error	3	0,0004	0,00013		
Total	5	0,0143			

Conclusión: Rechazar hipótesis nula. Existe una diferencia significativa entre las medias

◆ Prueba de Tukey:

	$\bar{y}_3$	$\bar{y}_2$	$\bar{y}_1$
	0,4415	0,426	0,3325
$\bar{y}_1 = 0,3325$	0,109	0,0935	0
$\bar{y}_2 = 0,426$	0,0155	0	
$\bar{y}_3 = 0,4415$	0		

$$DSH = q(3,3)(0,05) \sqrt{CME/6}$$

$$DSH = 0,02761$$

Conclusión: Existe una diferencia significativa entre las medias.





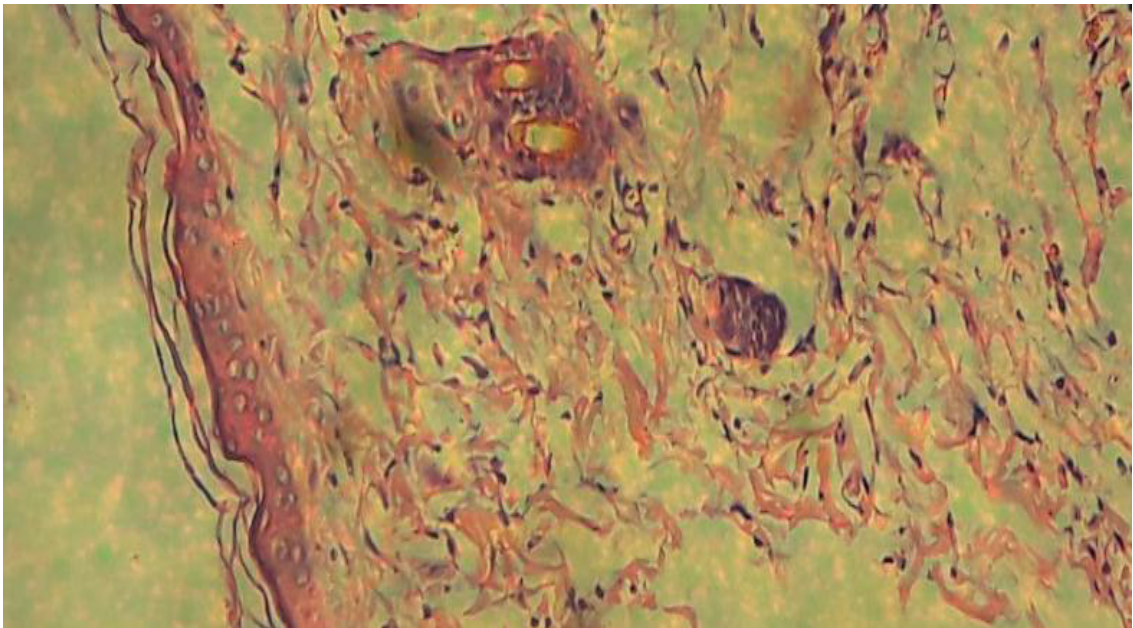
**Anexo C.** Estípites y frondas de *Lessonia nigrescens* Bory.



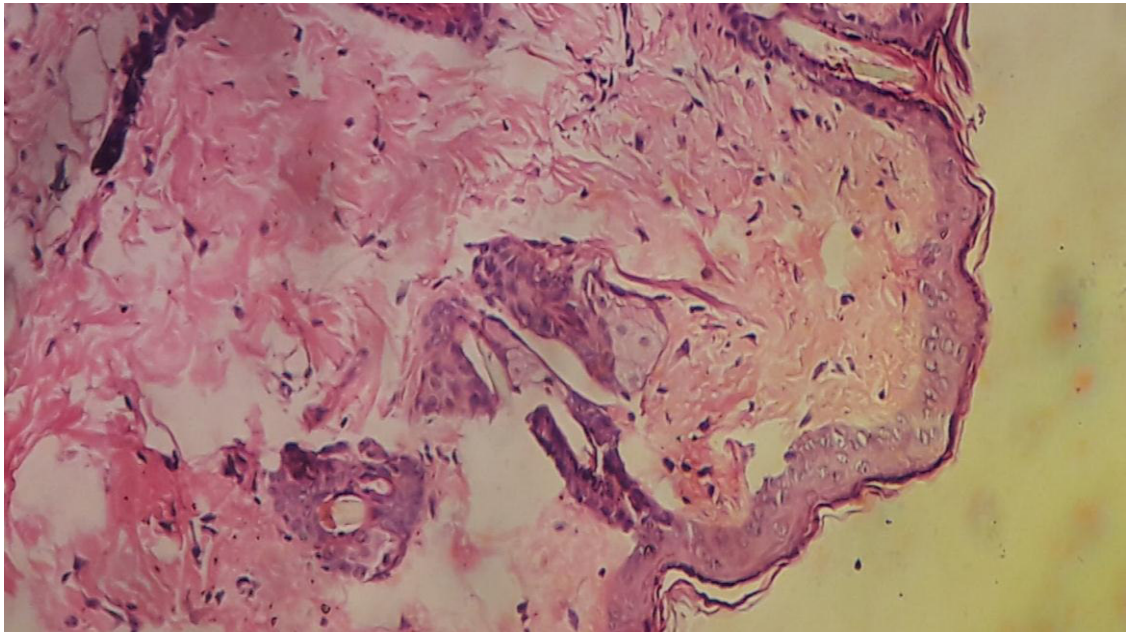
**Anexo D.** Rizoides, estípites y frondas de *Lessonia nigrescens* Bory.



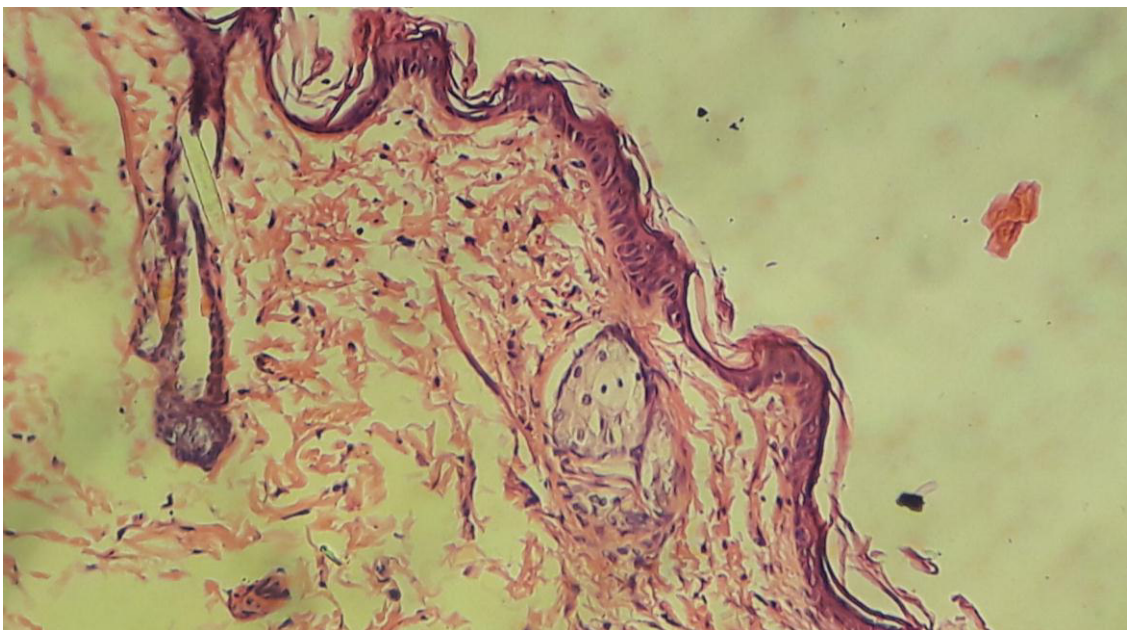
**Anexo E.** Frondas de *Lessonia nigrescens* Bory.



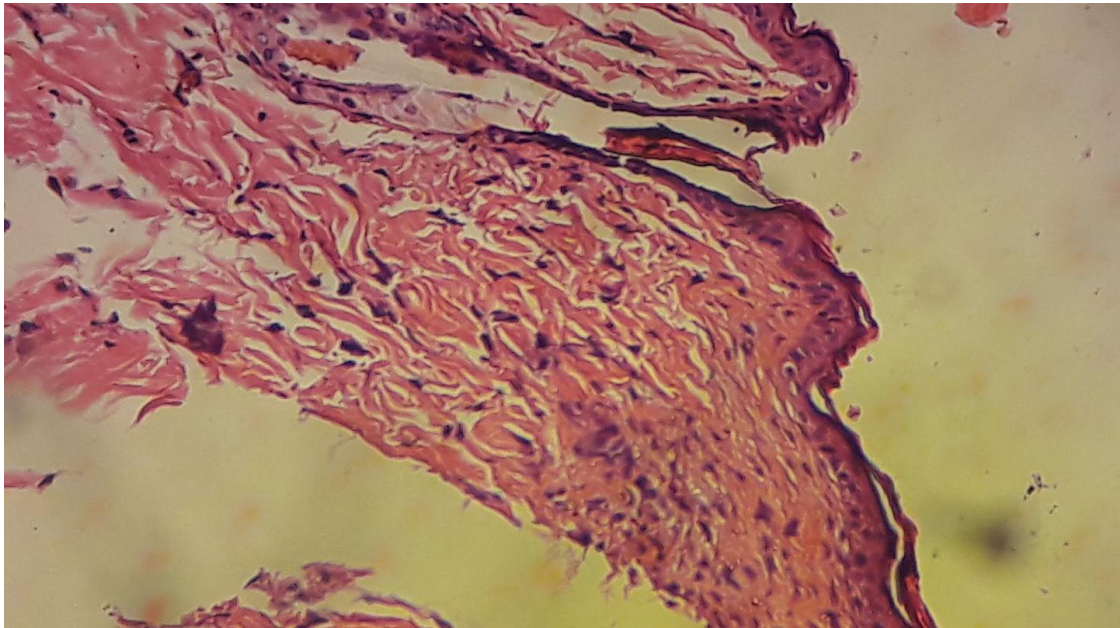
**Anexo F.** Corte histológico de piel grupo blanco. Muestra 1. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



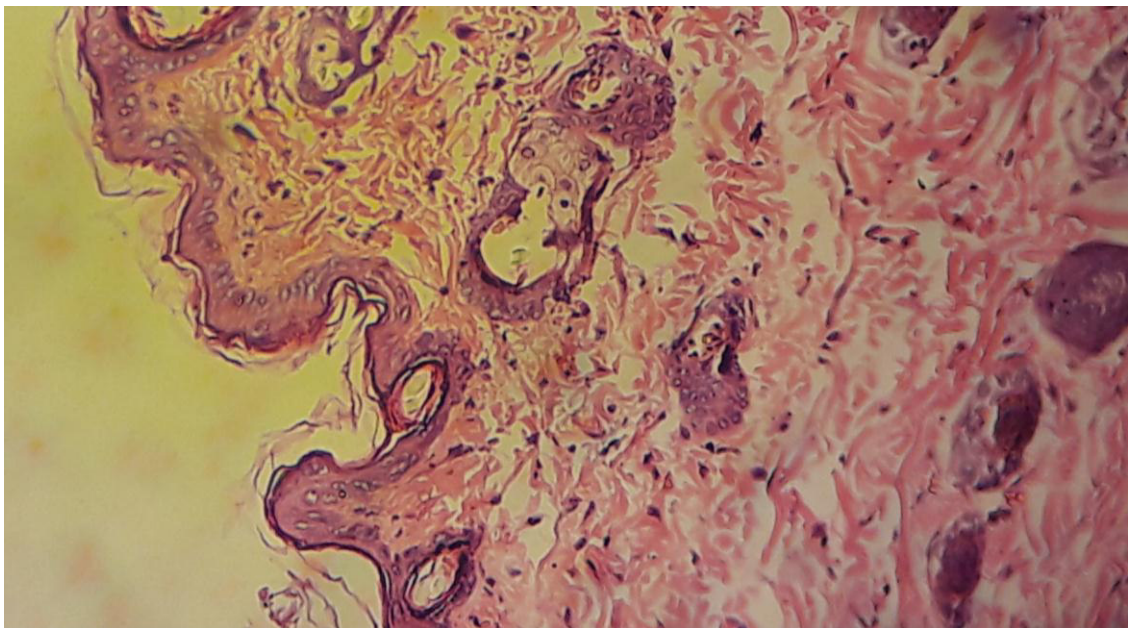
**Anexo G.** Corte histológico de piel grupo blanco. Muestra 2. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



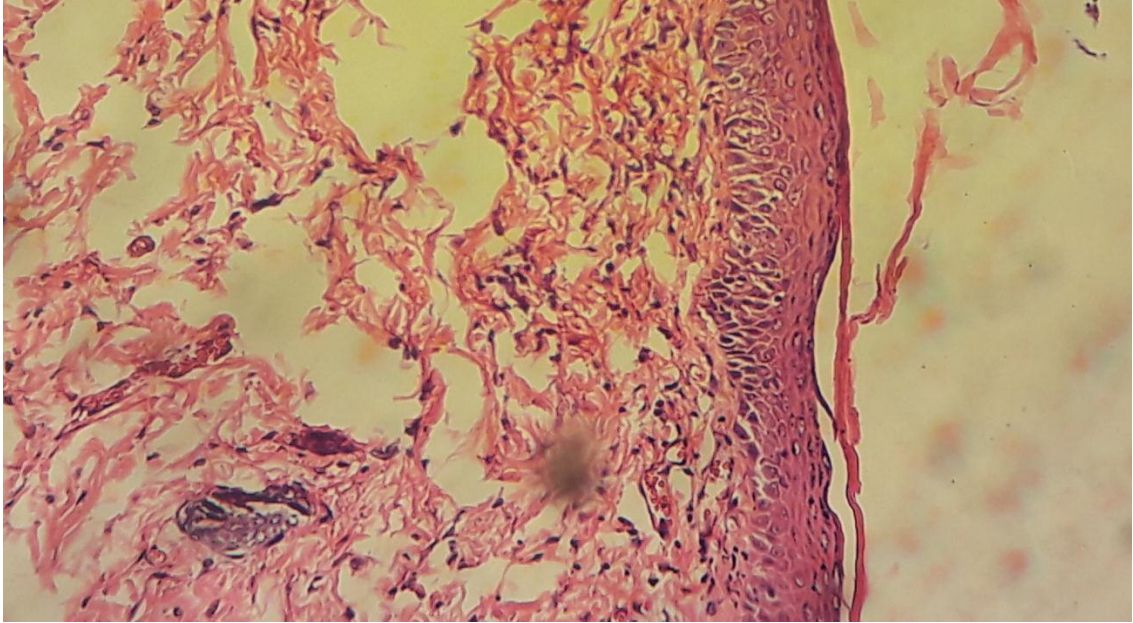
**Anexo H.** Corte histológico de piel grupo blanco. Muestra 3. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



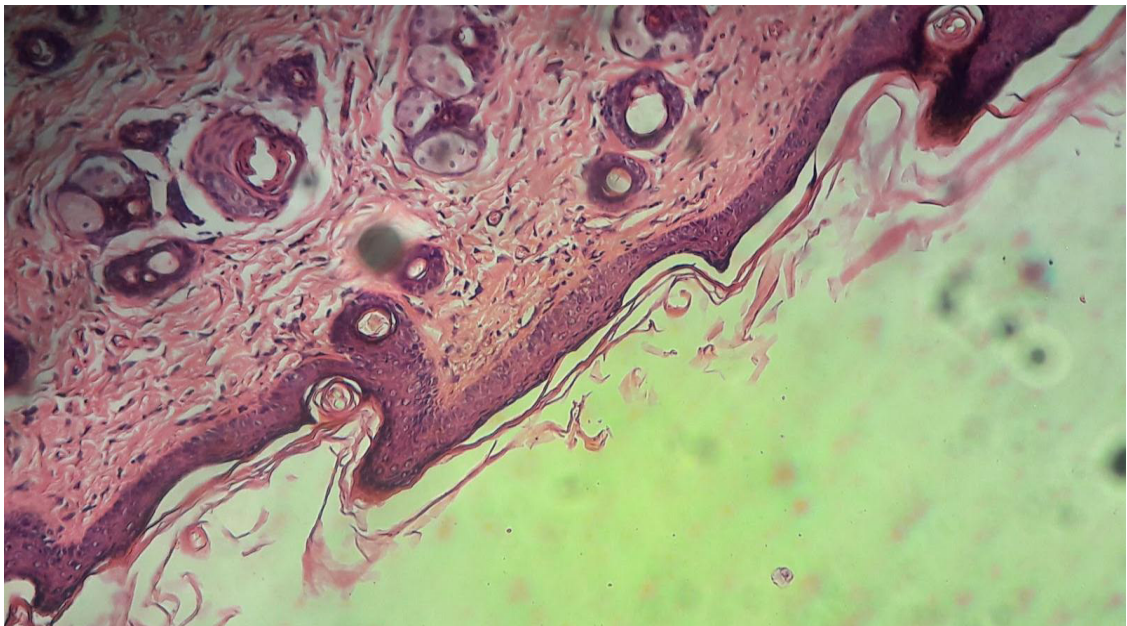
**Anexo I.** Corte histológico de piel grupo blanco. Muestra 4. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



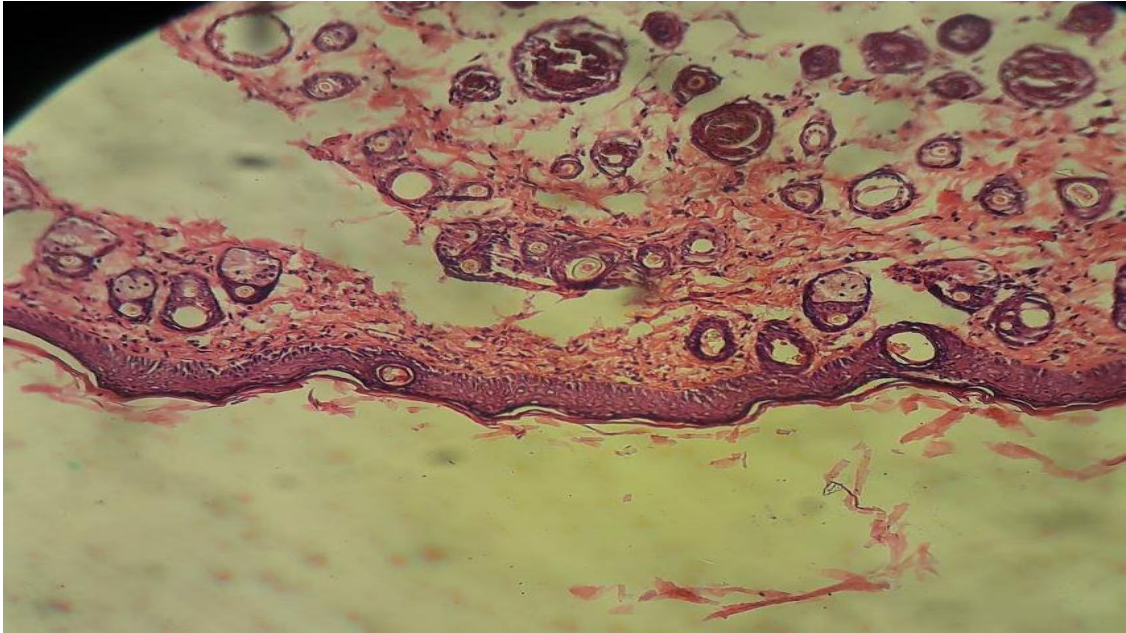
**Anexo J:** Corte histológico de piel grupo blanco. Muestra 5. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



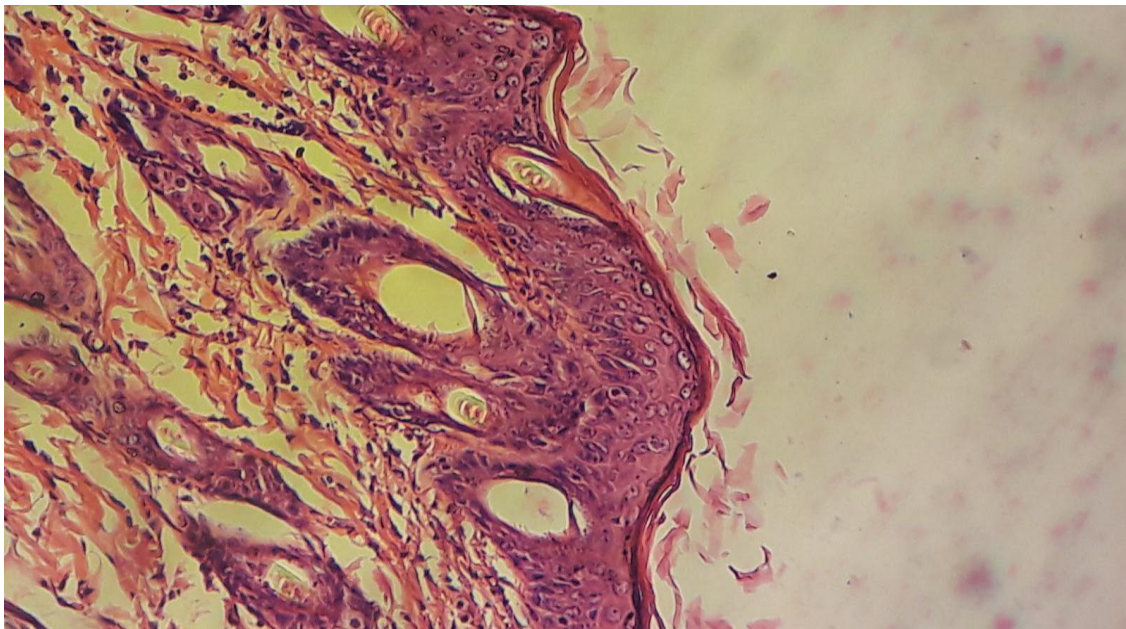
**Anexo K.** Corte histológico de piel grupo control. Muestra 6. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



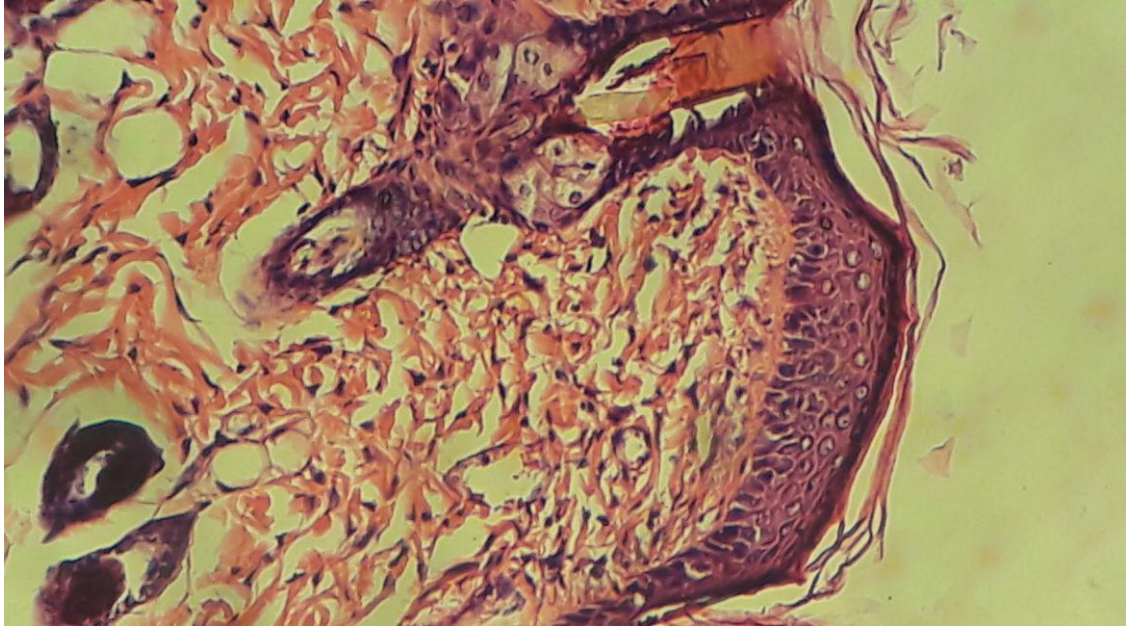
**Anexo L.** Corte histológico de piel grupo control. Muestra 8. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



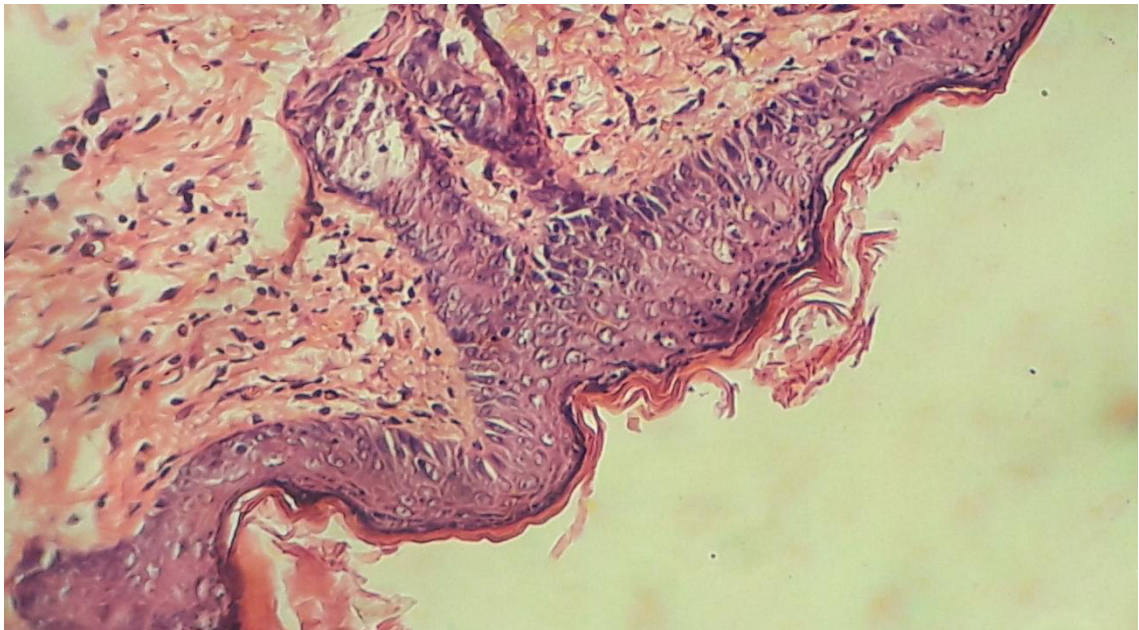
**Anexo M.** Corte histológico de piel grupo control. Muestra 9. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



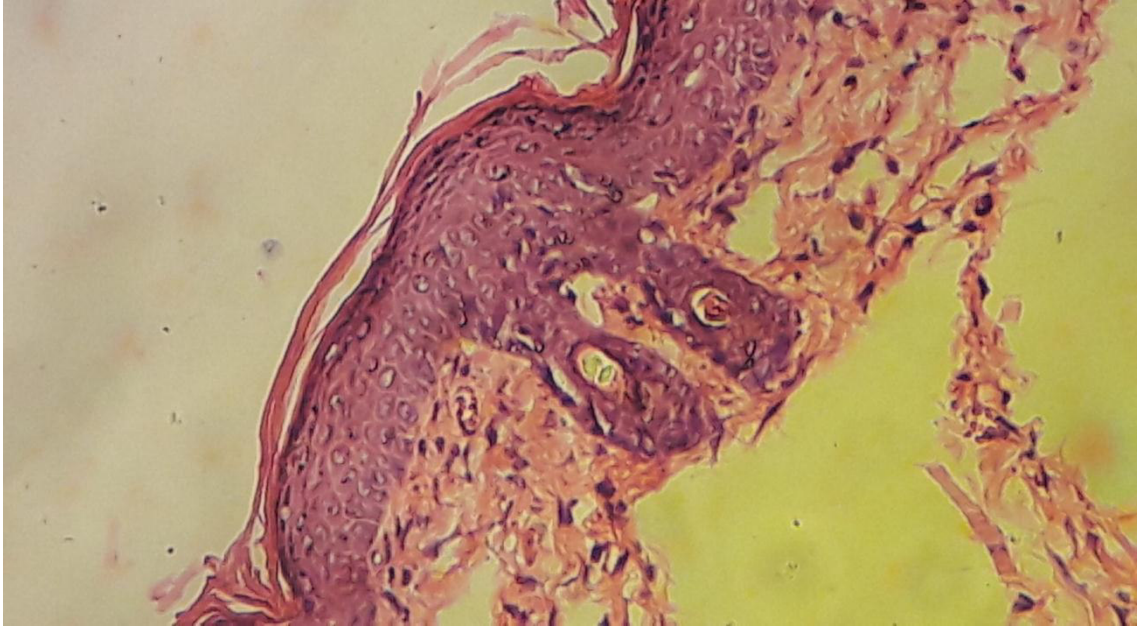
**Anexo N.** Corte histológico de piel grupo control. Muestra 10. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



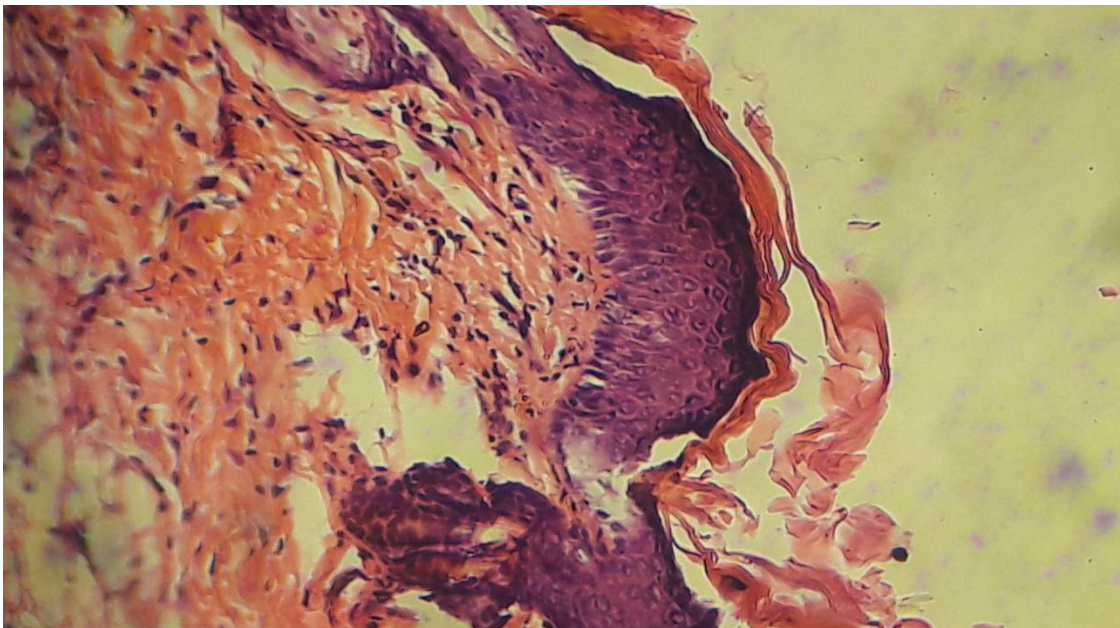
**Anexo Ñ.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 1%.  
Muestra 11. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



**Anexo O.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 1%.  
Muestra 12. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.

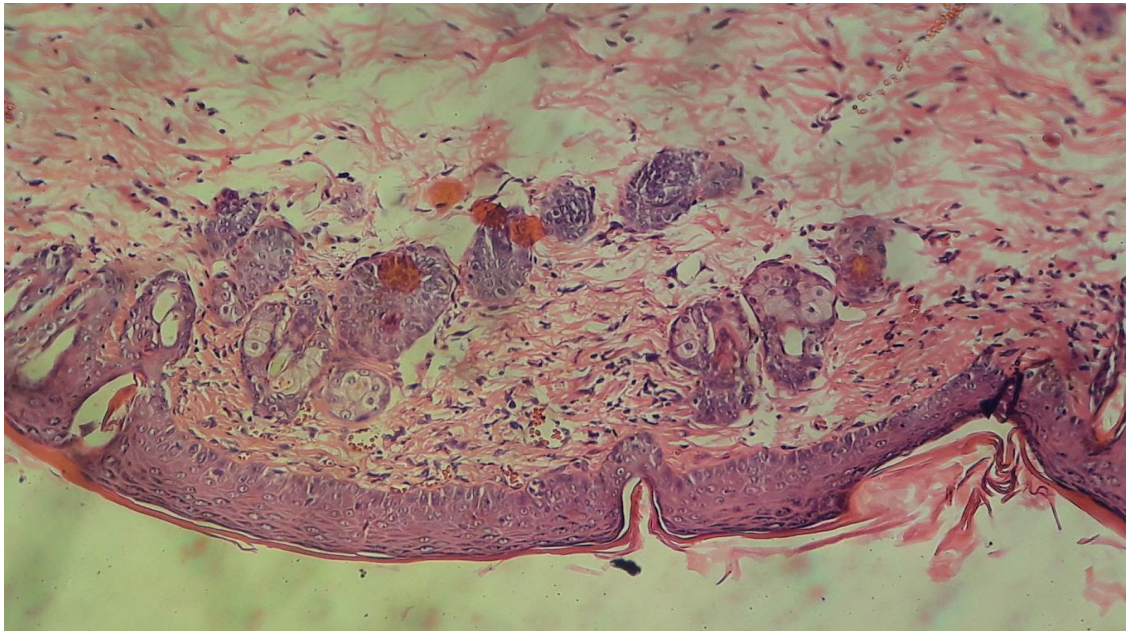


**Anexo P.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 1%.  
Muestra 13. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.

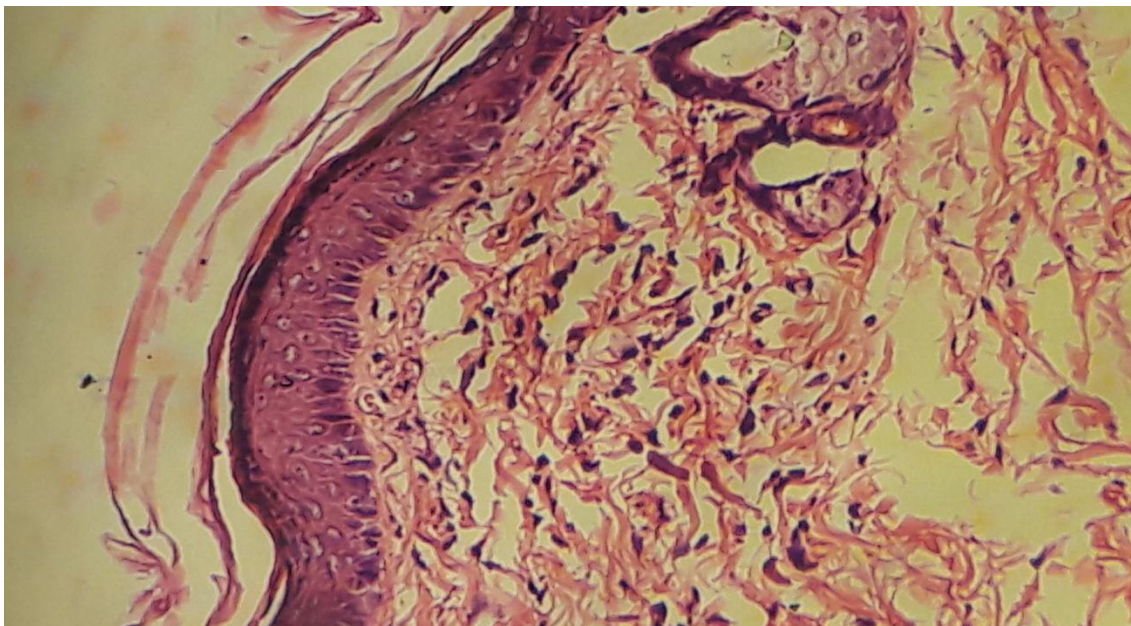


**Anexo Q.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 1%.  
Muestra 14. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.

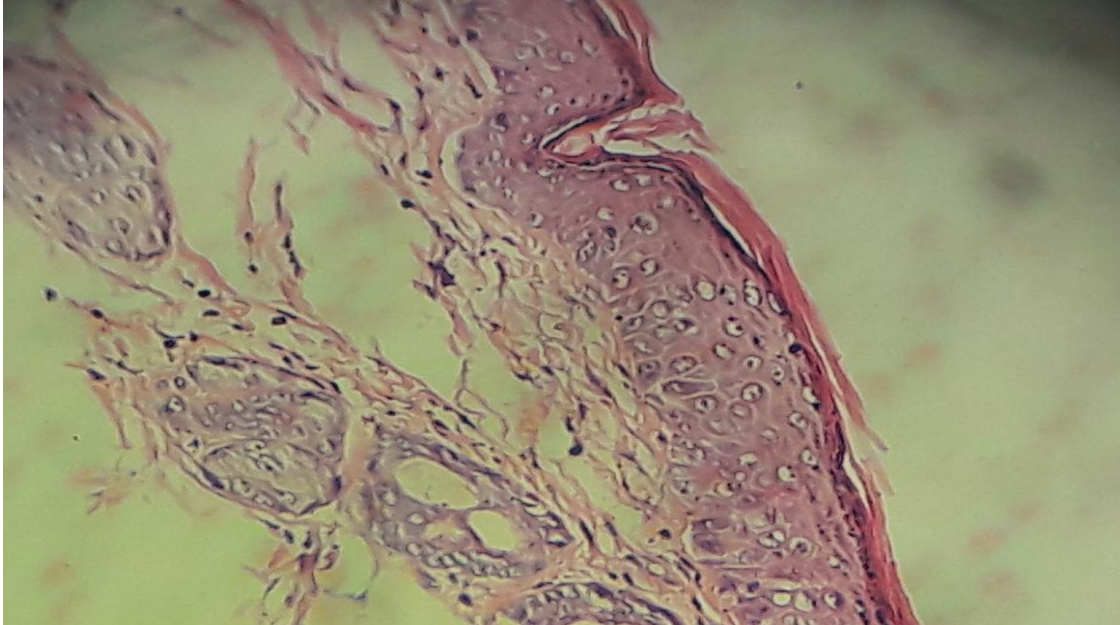




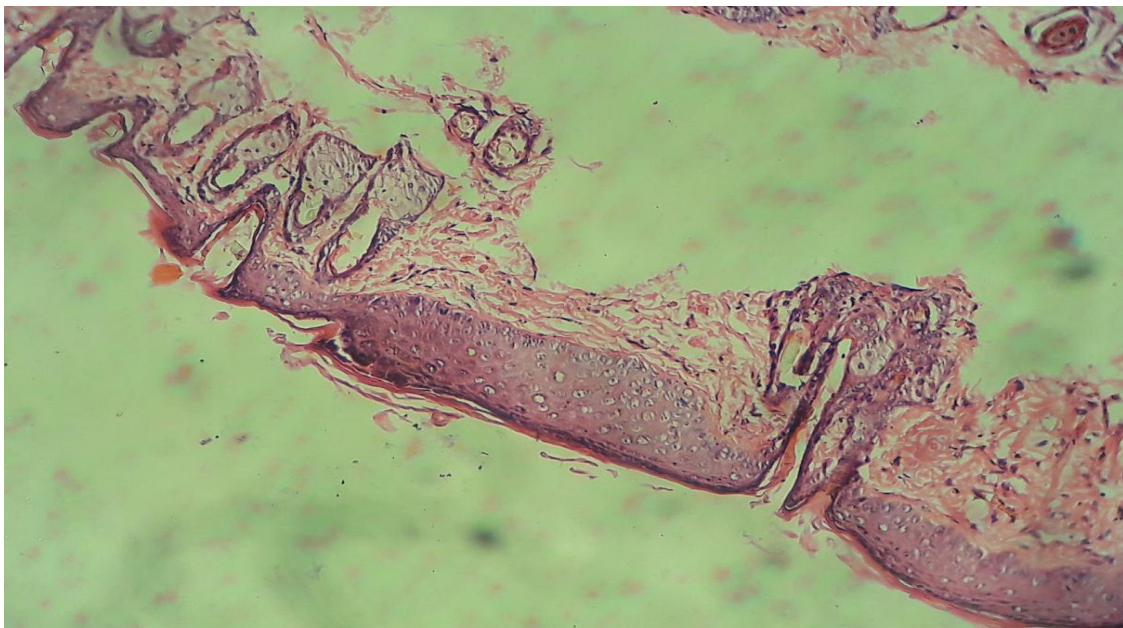
**Anexo R.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 1%.  
Muestra 15. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x



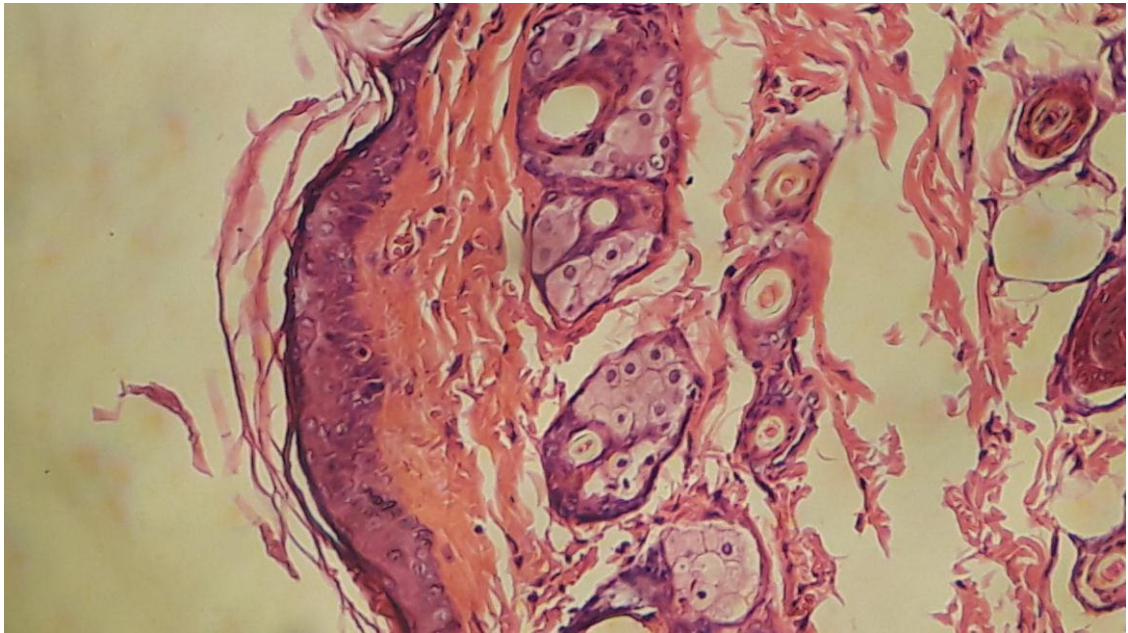
**Anexo S.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 3%.  
Muestra 16. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



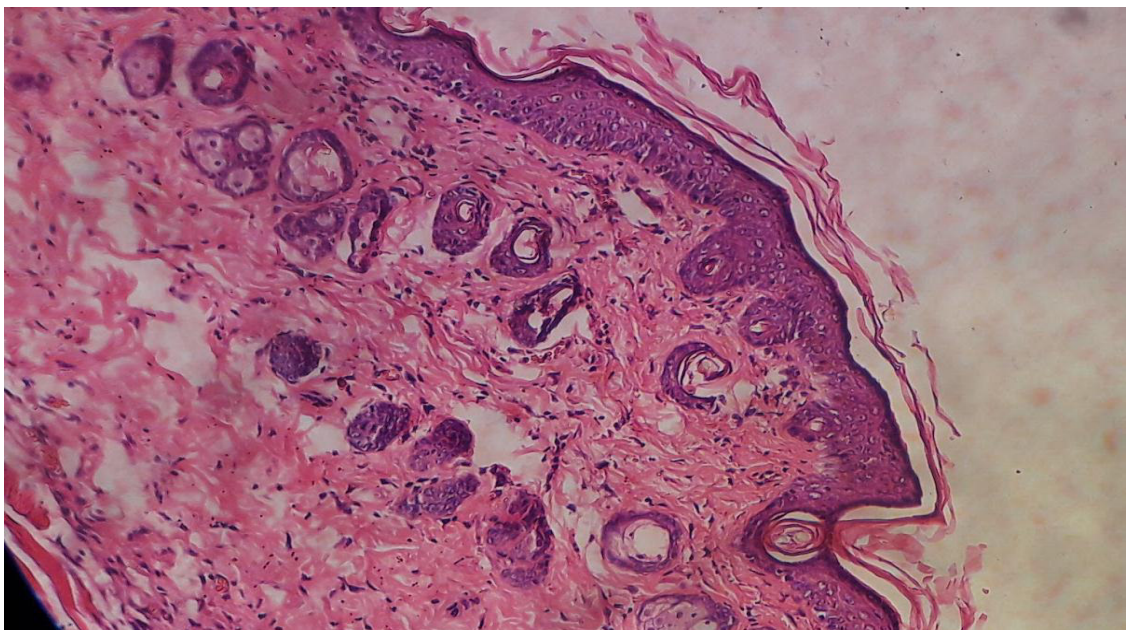
**Anexo T.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 3%.  
Muestra 17. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



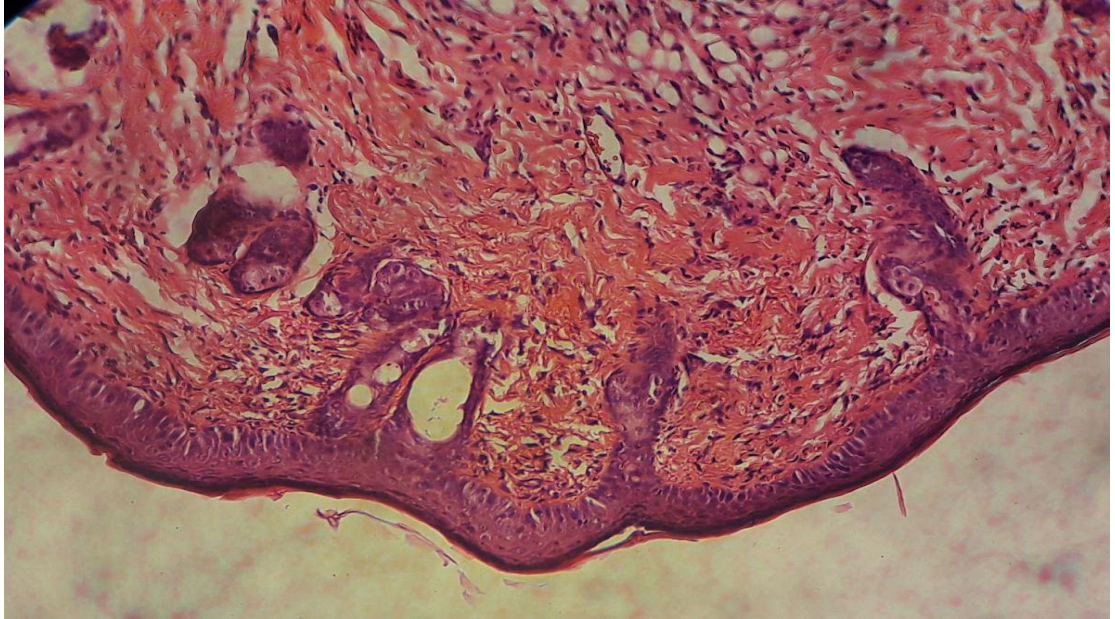
**Anexo U.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 3%.  
Muestra 18. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



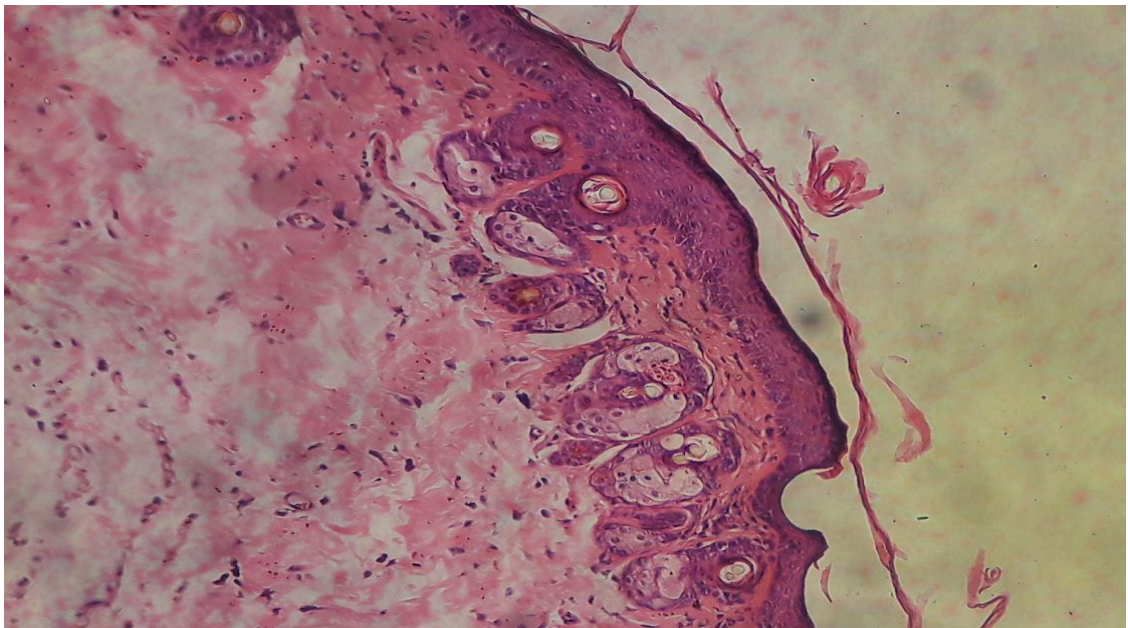
**Anexo V.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 3%.  
Muestra 19. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



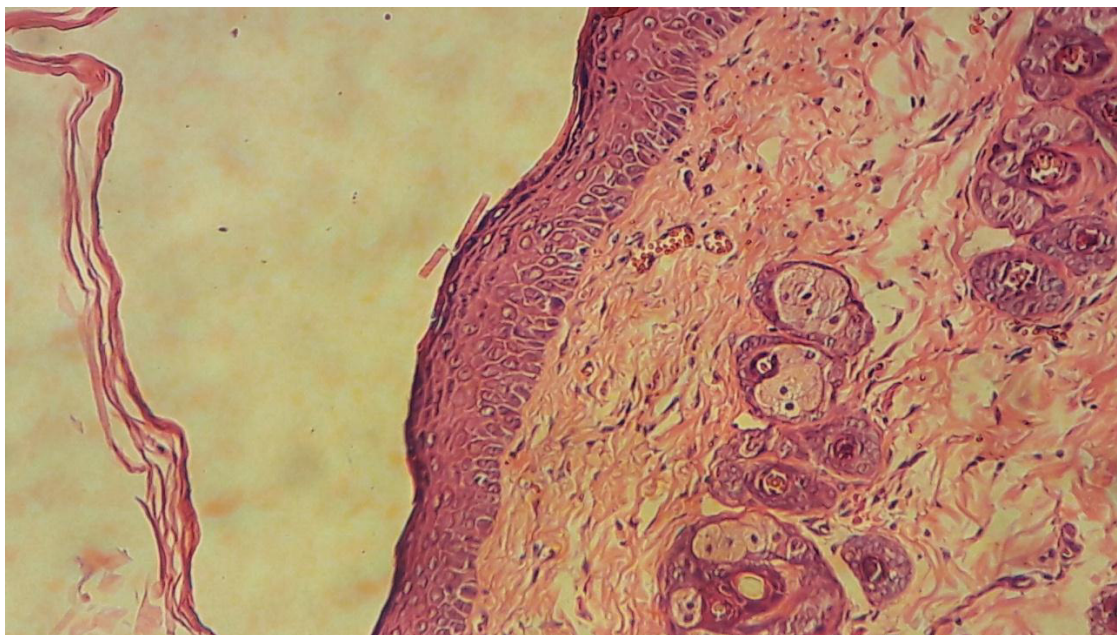
**Anexo W.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 3%.  
Muestra 20. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



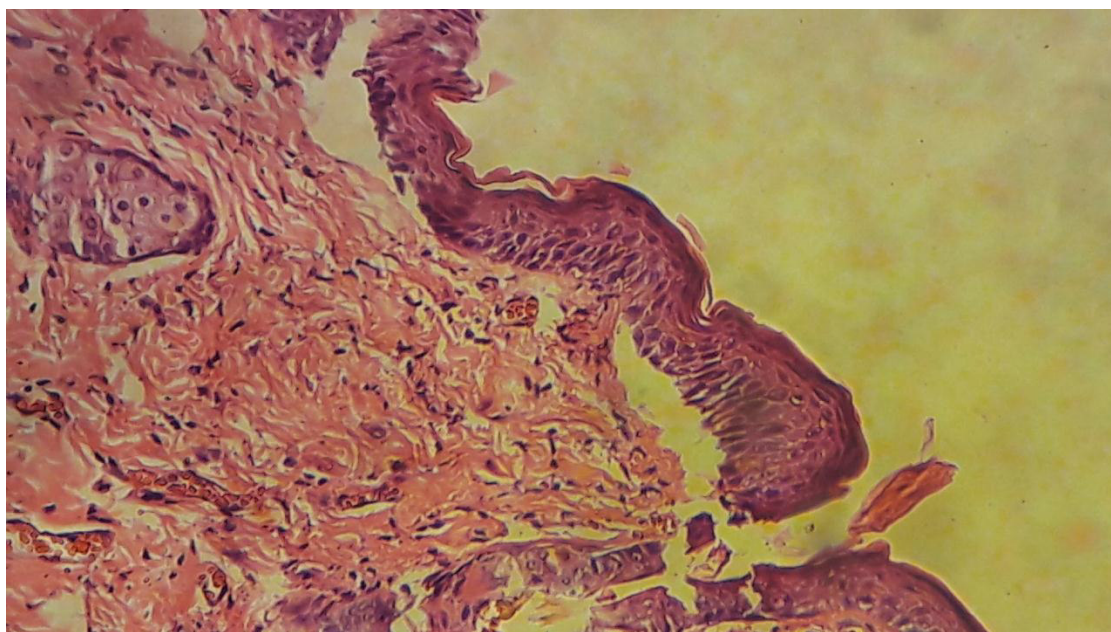
**Anexo X.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 5%.  
Muestra 21. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



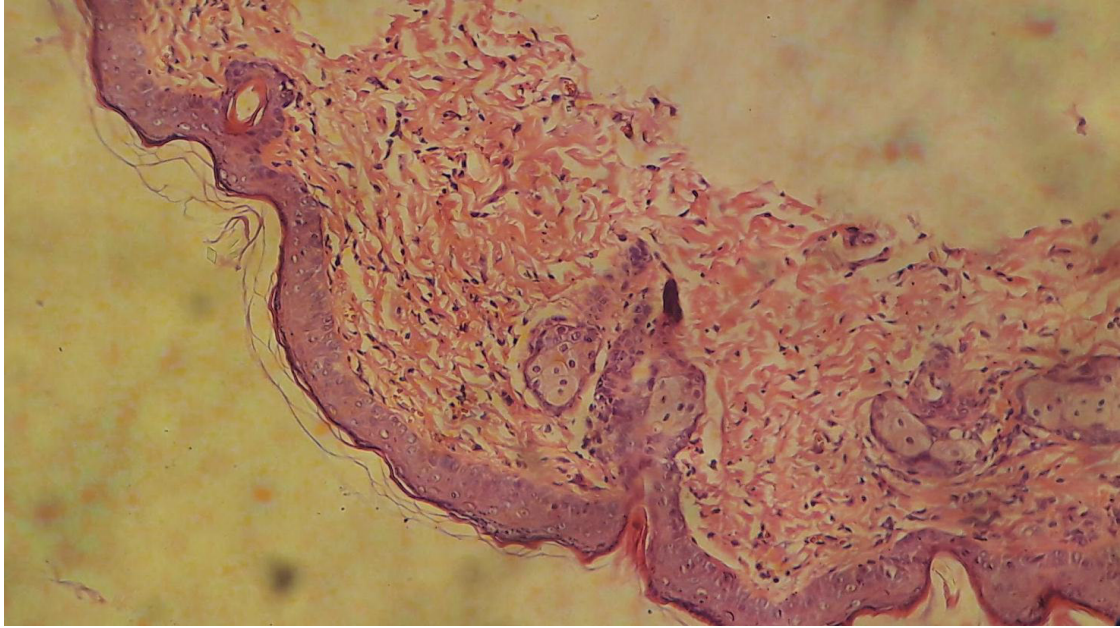
**Anexo Y.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 5%.  
Muestra 22. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x



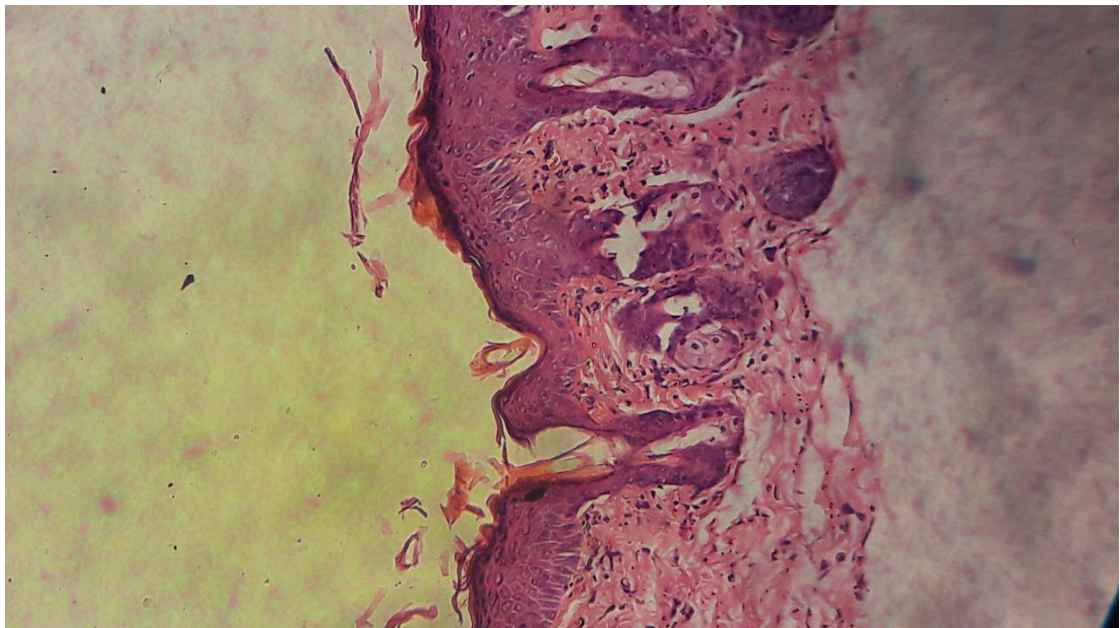
**Anexo Z.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 5%.  
Muestra 23. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



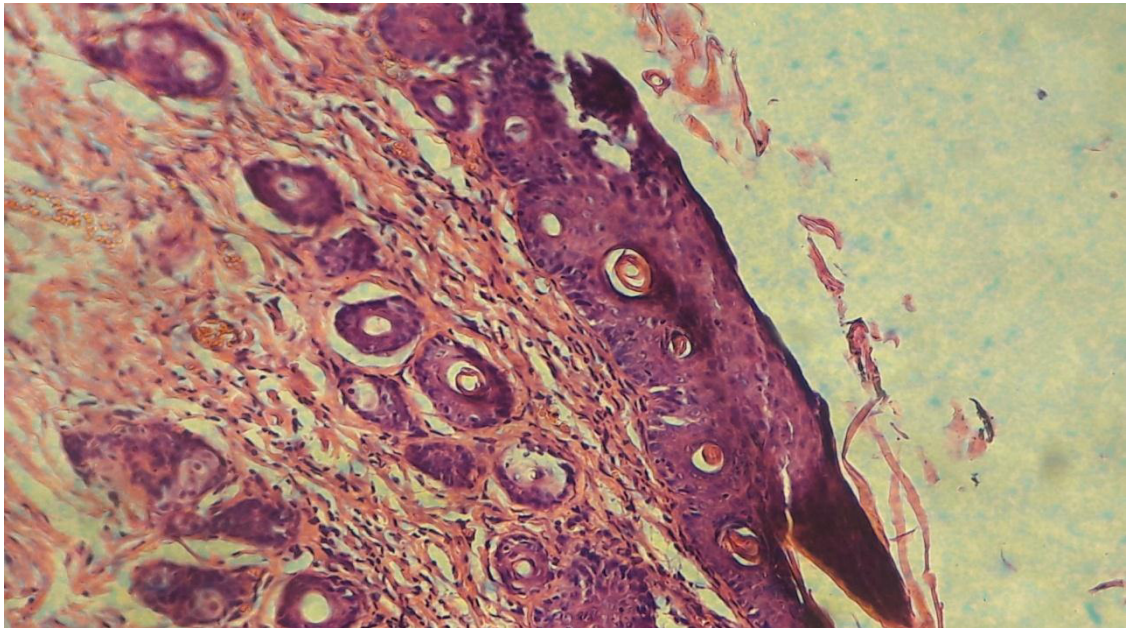
**Anexo A'.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 5%.  
Muestra 24. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



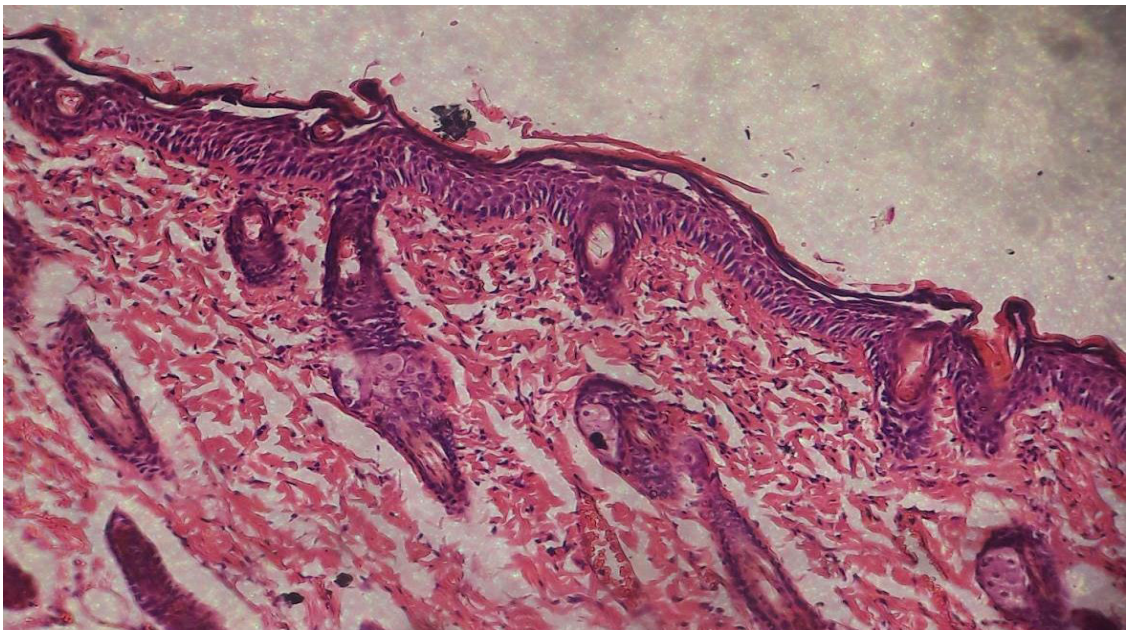
**Anexo B<sup>1</sup>.** Corte histológico de piel grupo intervención con crema al 5%.  
Muestra 25. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



**Anexo C<sup>1</sup>.** Corte histológico de piel grupo patrón con protector solar comercial.  
Muestra 27. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



**Anexo D<sup>1</sup>.** Corte histológico de piel grupo patrón con protector solar comercial.  
Muestra 29. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.



**Anexo E<sup>1</sup>.** Corte histológico de piel grupo patrón con protector solar comercial.  
Muestra 30. En Hematoxilina-Eosina aumento 100x.