



AVANCES EN EL DESARROLLO
DE INGREDIENTES NATURALES
BIOACTIVOS CON USO EN
COSMETOLOGÍA

RESUMEN

Los productos naturales juegan un papel relevante como fuente de ingredientes biológicamente activos con importancia cosmética y dermatológica. En los últimos años, los cosméticos basados en productos naturales han ganado una gran cantidad de atención no solo por parte de los investigadores sino también del público debido a la creencia general de que son mejores a los sintéticos, además de ser inofensivos, lo cual no necesariamente podría ser cierto, por lo que en este artículo se aborda la ciencia detrás de la formulación en los denominados cosméticos naturales, así como una descripción general de los ingredientes activos naturales que se pueden encontrar en ellos. Profundizamos en algunas pruebas: *in vitro*, *in silico* y *ex vivo*, utilizadas para analizar su efectividad como fotoprotectores solares, antienvjecimiento, anti-hiperpigmentación y toxicidad, así mismo se aborda la controversia que genera el uso de pruebas *in vivo*.

ABSTRACT

Natural products play an important role as a source of biologically active ingredients with cosmetic and dermatological importance. In recent years, cosmetics based on natural products have gained a great deal of attention not only from researchers but also from the public due to the general belief that they are better than synthetics, as well as being harmless, thus which probably couldn't be true, which is why this article addresses the science behind the formulation in so-called natural cosmetics, as well as an overview of the natural active ingredients that can be found in them. We delve into some tests: *in vitro*, *in silico* and *ex vivo*, used to analyze their effectiveness as sun photoprotectors, anti-aging, anti-hyperpigmentation and toxicity, as well as the controversy generated using *in vivo* tests.



Palabras clave: Productos naturales, bioensayos, cosméticos, validación.

Keywords: Natural products, bioassays, cosmetics, validation.

INTRODUCCIÓN:

Desde tiempos antiguos el ser humano ha tomado un gran interés en la belleza, dando como resultado el uso de productos para el cuidado de la piel o la higiene. Un ejemplo de esto son los baños en leche agria que Cleopatra hacía con la finalidad de hidratarse la piel, ya que uno de los componentes de la leche agria es el ácido láctico, empleado por su uso en preparaciones cosméticas como sustancia hidratante, iluminadora y antimicrobiana (Algiert-Zielińska et al, 2019). Además, para el cuidado de la piel han surgido muchos otros métodos lo largo del tiempo, dando como resultado la cosmetología, la cual es categorizada como una ciencia, así como un arte que se enfoca en el cuidado y embellecimiento de los caracteres estéticos de la piel sana, haciendo énfasis en la cara (Torres y Torres, 2005).

En la actualidad, un cosmético es definido de acuerdo con la FDA (2021) como un producto destinado a ser aplicado al cuerpo humano para limpiar, embellecer, promover el atractivo o alterar la apariencia. Tanto hombres como mujeres se preocupan por su estética, pero existen ciertas peculiaridades en torno a los productos que seleccionan para su uso. Los consumidores más jóvenes se preocupan por su apariencia externa así que buscan productos para verse mejor, mientras que los consumidores mayores escogen los que mantiene su salud, por lo que tienden a buscar productos antienvjecimiento (Torres y Torres, 2005).



La cosmetología, no solo se trata de perfeccionar el rostro con maquillaje, también abarca el cuidado del cuero cabelludo, limpieza de cutis, hidratación, rejuvenecimiento y ciertos tratamientos de acuerdo con el problema presentado en la piel, de tal manera que se vea saludable. Como afirman Rodríguez *et al.* (2018), Rodríguez-Sancan, (2019) y Mahesh *et al.* (2019) durante los últimos 20 años, la innovación en la industria cosmética fue enorme, resultando en una amplia gama de productos diseñados para proteger e hidratar la piel, así como para combatir la inflamación y las señales de la edad. Esta innovación dio como resultado la llegada al mercado de una gran ola de productos.

Paralelamente a esta explosión en el mercado, se comenzó a ver un fuerte impulso hacia la cosmética “natural”, “orgánica” o “verde” por parte de los consumidores, quienes daban gran importancia a la composición de sus productos, así como a su producción (Aburjai y Natsheh, 2003; Fonseca *et al.*, 2015; Mahesh *et al.*, 2019; Sabater y Mourelle, 2013). Estos nuevos conceptos devolvieron el uso de extractos naturales como ingredientes activos en cosmética a la vanguardia de la industria, y combinaron la reutilización de extractos antiguos como ingredientes activos con nuevas técnicas de extracción y purificación (Rodrigues *et al.* 2018).

Con este nuevo sistema de redacción en el etiquetado, se ha observado una gran confusión en cuanto a su significado. Con esto en mente, Fonseca *et al.* (2005) propone una clasificación más clara, denominando a los productos “verdes” como aquellos que fueron desarrollados o mejorados de acuerdo con estándares ecológicos y para satisfacer las expectativas del cliente, teniendo la misma calidad que el producto normal, pero causando menos daño al medio ambiente durante su ciclo de vida. Es en términos de “cosmética orgánica” y “natural” por ende la terminología se complica, iniciando porque el trabajo de definir un producto natural no es una tarea sencilla, ya que, estrictamente hablando, todo se deriva de la naturaleza. Sin embargo, por productos naturales generalmente se entiende que los productos no están hechos por síntesis química, y deben contener materias primas de origen orgánico (Fonseca *et al.*, 2015; Khan y Aburashed, 2011). Aparte de esto, dependiendo de dónde se comercialice el producto, las regulaciones sobre lo que constituye orgánico o natural cambia. Por ejemplo, en Brasil, la agencia de certificación de estos productos “Instituto Biodinâmico de Certificações”, IBD (2019) los clasificó como: orgánicos (al menos 95% de materias orgánicas certificadas), naturales (al menos 95% de materias primas naturales certificadas o no) y con ingredientes orgánicos u orgánicos crudos (entre el 70-95% de componentes orgánicos o naturales certificados en la formulación).

Además, en Europa se produjo una consolidación para crear un procedimiento estándar, llamado Cosmetics Organic Standard–Cosmos. Según COSMOS-STANDARD (2018), para que un cosmético se considere orgánico, debe tener al menos el 95% de ingredientes producidos orgánicamente. En el caso de la cosmética natural, no es necesario utilizar un nivel mínimo de ingredientes

orgánicos. Y en los EE. UU., el USDA (2008) permite cuatro categorías principales de etiquetado según el porcentaje de ingredientes orgánicos en el producto: "100% orgánico", "orgánico", "elaborado con ingredientes orgánicos" y "menos del 70% orgánico. Profundizando en los componentes naturales de estos cosméticos podemos deducir que, según su origen, tenemos ingredientes cosméticos de alto valor de: algas marinas, animales y plantas (Mahesh *et al.*, 2019).

SUB-APARTADOS TEMÁTICOS:

INGREDIENTES ACTIVOS DE PLANTAS

Se ha dicho que "hay una planta para cada necesidad en cada continente". El uso de plantas es tan antiguo como la humanidad. Alguna vez fueron la fuente principal y la base de todos los cosméticos antes de que se descubrieran métodos para sintetizar sustancias con propiedades similares. Ahora se está produciendo un renacimiento con plantas nuevas y antiguas que se utilizan como ingredientes en productos cosméticos ya sea como "extractos totales" de hierbas o "extractos selectivos". Los extractos totales siendo aplicados principalmente de acuerdo con la tradición histórica de su uso y los extractos selectivos empleándose de acuerdo con una investigación previa de su actividad específica (Aburjai y Natsheh, 2003).



Como resumen de los usos y plantas más comunes, para el tratamiento de la piel seca se ha utilizado: aceite de ricino (*Ricinus communis*), manteca de cacao (*Theobroma cacao*), mango (*Mangifera indica*), aceite de coco (*Cocos nucifera*), aceite de girasol (*Helianthus annuus*) y aceite de oliva (*Olea europaea*). Para el tratamiento del eccema: cúrcuma. (*Curcuma longa* L.). Para acné, manchas y granos: artemisia (*Artemisia vulgaris* y *Artemisia absinthum*), albahaca (*Ocimum sanctum*), guisante (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y cebolla (*Allium cepa*). Para el tratamiento antienvjecimiento de la piel: ginseng (ginseng coreano, *Panax ginseng* C.A. Meyer). Para efectos antioxidantes: té (*Camellia sinensis*) y semilla de uva. (*Vitis vinifera*). Para efectos antiinflamatorios: trébol rojo (*Trifolium pretense*), manzanilla (manzanilla alemana *Matricaria recutita* L o manzanilla romana *Anthemis nobilis* Linn.), fenogreco (*Trigonella foenum-graeceum*), aceite de jojoba (*Buxus chinensis* o *Simmondsia chinensis*) y regaliz. (*Glycyrrhiza glabra* L.). Para protección de la piel: aloe vera (*Aloe vera* L. Burm. F. o *Aloe barbadensis* Miller.) y avena (*Avena sativa* L.) (Aburjai y Natsheh, 2003; Fonseca *et al.*, 2015; Khan y Abourashed, 2011; Mahesh *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2018).

Para el cuidado del cabello, se puede dividir en:

- Estimulantes del crecimiento del cabello: se descubrió que las proantocianinas extraídas de las semillas de uva promueven la proliferación de las células del folículo piloso *in vitro*. Estudios sugirieron que el extracto de hoja de *Ginkgo biloba* también promueve el crecimiento del cabello. La salvia (*Salvia officinalis* L.) ha sido utilizada como loción para mejorar la condición del cabello.
- Como tratamiento de la caspa: Tradicionalmente, la salvia (*Salvia officinalis* L.) es un antiguo favorito para la caspa, la caída del cabello y el cabello y la piel grasosa. También se ha afirmado que el tomillo (*Thymus vulgaris* L.) inhibe la caspa (Aburjai y Natsheh, 2003).

Todos estos usos se basan en la naturaleza fitoquímica de la planta, su contenido cualitativo, el cual puede ser clasificado dentro del ámbito cosmético en: carbohidratos, resinas y taninos, glucósidos, grasas, aceites y ceras, aceites esenciales y alcaloides (Mahesh *et al.*, 2019), cada uno teniendo propiedades distintas que le confieren usos preferidos o áreas de la piel en donde son mejor utilizados. (1) Carbohidratos: Los productos naturales que contienen carbohidratos se utilizan principalmente en cosmética como emolientes, emulsionantes, suspensores y adhesivos. (2) Resinas y taninos: Las resinas son productos amorfos complejos producidos por plantas con amplia aplicación en la industria cosmética. Los taninos son los metabolitos secundarios de las plantas, utilizados principalmente como astringentes y antisépticos en preparaciones para el cuidado de la piel. Glucósidos: el componente clave responsable de las actividades biológicas de los glucósidos son los azúcares y son principalmente usados como surfactantes. (3) Grasas, aceites y ceras: la naturaleza química de la piel y el sebo promueve la utilidad de grasas, aceites y ceras como productos para

el cuidado de la piel. (4) Aceites Esenciales: Los aceites esenciales son principios aromáticos aislados de las plantas y son usados como fragancias y preservativos, entre otras funciones. Y (5) Alcaloides: Los alcaloides son compuestos nitrogenados de considerable valor medicinal y cosmético que se encuentran en las plantas (Mahesh *et al.*, 2019).

La mayoría de las plantas tienen estos metabolitos en diferentes cantidades y partes de sí mismas, por lo que los investigadores deben tener un conocimiento profundo para desarrollar productos a partir de la planta, sección e incluso de la época adecuada de colecta.



INGREDIENTES ACTIVOS DE ALGAS MARINAS

Aparte de los fitoquímicos terrestres, el mar es un inmenso tesoro de compuestos bioactivos de algas, peces y organismos submarinos. Las macroalgas son las fuentes más ricas en ficocoloides, compuestos con la capacidad de retener cantidades significativas de agua y la capacidad de formar geles; y sus principales características explotadas en la industria cosmética incluyen su capacidad antioxidante, su actividad de potenciador de colágeno, actividad antiinflamatoria, protección solar, absorción de rayos UV, inhibición de la producción de melanina e hidratación. Los dos ficocoloides principales son el agar y el carragenano, que se aíslan de *Gelidium cartilagineum*, *Gracilaria confervoides*, *Chondrus crispus* y *Gigartina mamillata*, estos extractos se utilizan para la fabricación de cremas, lociones corporales, jabones, champús, acondicionadores para el cabello, pastas dentales, desodorantes, cremas de afeitar, perfumes y artículos de maquillaje (Pangestuti y Kim, 2015; Mahesh *et al.*, 2019).

Uno de los ficocoloides de mayor valor en la industria es la alga, que en su mayoría se extrae de *Macrocystis pyrifera*, debe su valor a su uso como agente emulsionante, suspensor, espesante, estabilizante y gelificante en la industria.

INGREDIENTES ACTIVOS DE OTRAS FUENTES NATURALES

La exploración y utilización de productos animales en cosméticos está limitada por barreras éticas, étnicas y religiosas. Por lo tanto, solo unos pocos productos se usan regularmente en productos cosméticos, algunos

de los cuales se revisan aquí. La miel es una secreción dulce y viscosa que contiene principalmente azúcares y se obtiene de las abejas (*Apis mellifera*), se utiliza para tratar granos y labios agrietados. Comercialmente, la miel se usa como ingrediente en formulaciones de lavado de cara, mascarillas, lociones humectantes, exfoliantes y cuidado del cabello. La cera de abejas obtenida de *A. mellifera* se utiliza como base de ungüento y agente endurecedor. Es un componente de cremas frías, desodorantes, depilatorios, cremas para el cabello, acondicionadores para el cabello y cosméticos para los ojos (Bogdanov, 2016; Burlando y Cornara, 2013).

INVESTIGACIÓN EN COSMÉTICOS NATURALES ENSAYOS *IN VITRO*

El objetivo principal de los ensayos *in vitro* que se expondrán en este caso, son de suma importancia para evaluar la seguridad de los productos que se estarán utilizando en la cosmetología y para el propio cuidado personal. Así mismo, estos ensayos son de los recursos más utilizados en este campo ya que, se desarrollan fuera de un organismo vivo, ya sea mediante la implementación y uso de tubos de ensayos, medios de cultivos en ambientes artificiales entre otros (Real Academia Nacional de Medicina de España, 2021).



En este caso, los productos naturales están siendo una revolución en la cosmética, se puede apreciar al observar en las preferencias de las personas. Por lo tanto, los productos verdes podrían ser capaces de reemplazar a los productos que no lo son en el mercado, por lo que se deben validar su efectividad y accesibilidad (Ottman, 1993).

DETERMINACIÓN DE FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)

La piel está en constante exposición a la radiación ultravioleta, lo cual trae consigo daños como lo son las quemaduras solares, cáncer de piel y envejecimiento prematuro. Por lo que existen productos de protección solar que se pueden aplicar al cuerpo para prevenir estos daños a la piel, debido a que estos contienen absorbentes o bloqueadores de luz UV. Estos productos son ampliamente comercializados y de

gran importancia para el cuidado personal por lo que deben someterse a pruebas que evalúen su seguridad y determinar las cantidades adecuadas para su uso. El criterio biológico para la determinación del SPF, siglas de la palabra en inglés "Sun Protection Factor" o Factor de Protección Solar (FPS) es el enrojecimiento de la piel, también conocido como eritema. Los métodos *in vitro* utilizados para validar de este tipo de productos son seguros, sencillos, rápidos y económicamente más rentables en comparación a los modelos *in vivo* (Roy *et al.*, 2013).

Uno de los métodos más utilizados es el sugerido por Ashawat y Saraf (2006) y Kaur y Saraf (2011). En donde se exponen $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de la muestra a analizar a distintas longitudes de onda (290 nm a 320 nm) y se determina la absorbancia/transmitancia de la sustancia, para esto se realizan mediciones en intervalos de 5 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible.

El intervalo de tiempo más bajo o la dosis de irradiación de luz UV suficiente para producir un eritema más pequeño y perceptible en la piel sin protección se conoce como EMP. Por esto, la eficacia del protector solar FPS se calcula al dividir una dosis de EMP con protector solar y otra sin protector solar en piel protegida. Por lo tanto, al obtener los resultados, si es más alto el valor de FPS, indica que el producto es más eficaz en la prevención de quemaduras solares (Roy *et al.*, 2013).

DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ELASTASA

La elastina es material extracelular que forma parte de un tejido y es una de las más abundantes en órganos que aportan elasticidad a los tejidos conectivos. Así mismo, forma fibra elástica en la dermis de la piel, lo que puede dar resultado a un aumento en la elasticidad de la piel. Un daño a estas fibras podría ocasionar debilitamiento en la resistencia de la piel. Por lo que, el tipo de ensayo de inhibición de la elastasa se puede utilizar para determinar el efecto de mantener la elasticidad natural de la piel. (Roy *et al.*, 2013).

Los modelos *in vitro* utilizados para investigar este efecto, se basan en técnicas espectrofotométricas, siendo el sustrato más habitual el sugerido por Abhijit y Manjushree, (2010). Primero se libera este sustrato, el N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p nitroanilida por 15 minutos a 25°C y esto se controla midiendo la absorbancia a 410 nm. Además, la muestra de prueba tiene que ser pre-incubada con la enzima durante 20 min a 25°C y la reacción se inicia al añadir el sustrato que se estará utilizando. Al mismo tiempo, se utiliza un buffer como control y los cambios que se presentan se monitorean a 410 nm utilizando un espectrofotómetro UV.

INHIBICIÓN DE LA COLAGENASA

El colágeno es una proteína que compone el 80% de la piel humana, la cual es responsable de aportar elasticidad, flexibilidad y fuerza necesaria para prevenir la degeneración de los tejidos presentes en el cuerpo humano. Por ende, con menos deterioro y más

regeneración, la piel permanece de mejor manera, el cabello se puede fortalecer, se mejora la resistencia en los huesos y en las articulaciones (Schoenfeld, 2018). Por lo anterior, la integridad de esta proteína es fundamental para mantener la apariencia de turgencia y lozanía de la piel, por lo que se han desarrollado ensayos *in vitro* para analizar inhibidores de las enzimas colagenasas, las cuales están involucradas en la degradación del colágeno.

En este tipo de ensayo la colagenasa se inhibe para aumentar la elasticidad de la piel y fuerza extensible (Roy *et al.*, 2013). El ensayo rutinario se basa en métodos espectrofotométricos reportados por Thring *et al.* (2009), con algunas modificaciones para su uso en un lector de microplacas. El ensayo consiste en disolver la colagenasa de *Clostridium histolyticum* a una concentración inicial de 0.8 unidades/mL en un buffer de tricina de 50 mM. Se utiliza como control, el sustrato N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA). Las muestras (extractos o compuestos) a $25 \mu\text{g}$ se incuban por 15 minutos y se lee su absorbancia a 335 nm por un lapso de 30 min en un lector de microplacas. Como control positivo se utiliza epigallocatequina.

ENSAYOS *IN SILICO*

Vivimos en un mundo de químicos. Se sabe que existían más de 60 millones de compuestos químicos en 26 de mayo de 2011 (Raunio, 2011). Por lo tanto, aprovechar sus propiedades en diferentes áreas como el desarrollo de medicamentos, la investigación de cosméticos y productos para el cuidado personal es una necesidad. Los productos naturales nos proporcionan una gran ventaja porque, como afirman representan una fuente casi infinita de productos químicos, tienen una diversidad asombrosa y actualmente se cuenta con millones de datos ya conocidos que pueden ser utilizados para extraer conocimiento aplicando métodos *in silico* (Rollinger *et al.*, 2006).

La metodología *in silico*, representa una de las más recientes incorporaciones al cinturón de herramientas de los investigadores en el área de investigación y desarrollo de nuevas terapias. Razón por la cual resulta menos conocida para el público que los métodos *in vitro* e *in vivo*, por lo que a continuación se abordará de manera breve una introducción sobre el uso y fundamento de estas técnicas: *In silico*, es una expresión que se utiliza para referirse a "realizado en computadora o mediante simulación por computadora" (Raunio, 2011). Este enfoque puede reducir drásticamente tanto el tiempo como los costos asociados con la búsqueda de DTI o interacciones fármaco-objetivo. Cabe destacar que la tecnología *in silico* se desarrolló en la industria farmacéutica, pero sus usos han crecido más allá de esta rama y hoy en día son ampliamente utilizadas en el área cosmética.

Hay cinco enfoques computacionales, según lo establecido por Fang *et al.* (2018) para identificar nuevos objetivos de productos naturales: (1) basados en objetivos, (2) basados en ligandos, (3) basados en quimiogenómicos, (4) basados en redes y (5) enfoques de biología de sistemas basados en la "ómica". De

ellos, los dos primeros son los más utilizados en el área cosmética. Cada una de estas estrategias ha desarrollado sus propias técnicas, que se describen a continuación e incluyen algunos ejemplos.

ENFOQUES BASADOS EN OBJETIVOS

También se les conoce como enfoques basados en la estructura de proteínas, predicen proteínas diana de productos naturales, que se basa en el conocimiento de la estructura tridimensional (3D) de la diana biológica (Fang *et al.*, 2018). El “docking molecular” es el enfoque basado en objetivos más común.

La técnica de “docking molecular” se puede utilizar para modelar la interacción entre una molécula pequeña y una proteína a nivel atómico. El proceso de acoplamiento implica dos pasos básicos: la predicción de la conformación del ligando y la evaluación de la afinidad de unión. Estos dos pasos están relacionados con los métodos de muestreo y los esquemas de puntuación, respectivamente, que nos dan la disposición más probable (Meng *et al.*, 2011). A partir de este enfoque, se han desarrollado múltiples softwares, y están en constante uso en la industria cosmética. Prueba de ello son las investigaciones realizadas por Deniz *et al.* (2020), Fong *et al.* (2014), Palacines *et al.* (2020), ya se ha reportado el uso de la técnica de acoplamiento para confirmar la capacidad del ácido cumárico para inhibir la tirosinasa (Varela *et al.*, 2020). Esta enzima interviene en los pasos iniciales de la síntesis de melanina, el pigmento responsable del color de ojos, cabello y piel, abriendo así la posibilidad de utilizarla como tratamiento para la hiperpigmentación. Palacines *et al.* (2020) también implementaron estudios de acoplamiento a la tirosinasa y los principales metabolitos de la planta *Cakile marítima* Scop. (Brassicaceae), utilizando el resultado de esta técnica junto con otros estudios para determinar que los extractos de estas plantas también tenían la capacidad de inhibir esta enzima.

Deniz *et al.* (2020) adoptaron un enfoque más amplio, utilizando los compuestos aislados de *Cotinus coggygria* Scop. en la técnica de acoplamiento contra las enzimas colagenasa, elastasa y tirosinasa, ya que son uno de los principales objetivos de la industria cosmética para el desarrollo de nuevos compuestos antiarrugas y aclaradores de la piel, encontrando resultados prometedores en sus compuestos, concluyendo que su planta sería una materia prima vegetal adecuada para productos cosméticos con propiedades antienvjecimiento. Finalmente, Fong *et al.* (2014) en su trabajo, más de 20.000 ingredientes herbales de 453 hierbas fueron acoplados a un modelo de tirosinasa con la esperanza de encontrar un inhibidor más fuerte que los encontrados en el mercado, encontrando 7, además de este requisito de selección se predijo que no resultarían irritantes, corrosivos ni cancerígenos.

ENFOQUES BASADOS EN LIGANDOS

Se utilizan comúnmente cuando la estructura 3D de una proteína objetivo no está disponible. Este enfoque se basa en el conocimiento de otras moléculas similares

que se unen al objetivo biológico de interés. Los enfoques basados en ligandos se pueden dividir ampliamente en enfoques basados en similitudes y basados en aprendizaje automático (ML) (Fang *et al.*, 2018).

La industria cosmética maneja mayoritariamente la basada en similitudes, siendo el más conocida, el software PASS, que permite estimar el perfil probable de actividad biológica de un compuesto orgánico tipo fármaco en base a su fórmula estructural. Esto se basa en el análisis de las relaciones estructura-actividad para un amplio conjunto de entrenamiento que incluye sustancias farmacológicas, candidatos a fármacos en diversas etapas de la investigación clínica y preclínica, agentes farmacéuticos, sondas químicas, y compuestos, para los que se conoce información específica de toxicidad (Filimonov *et al.*, 2014). Mediante el uso de esta herramienta Deniz *et al.* (2020), demostraron el potencial de compuestos aislados de *Cotinus coggygria* en la inhibición de enzimas utilizadas como blanco para el desarrollo de productos antienvjecimiento.

ENSAYOS *EX VIVO*

Las formulaciones de los cosméticos funcionales deben incluir principios activos reconocidos como seguros y aporten algún efecto beneficioso (Espinosa-Leal y García-Lara, 2019). En este reconocimiento, uno de los métodos de prueba más controvertidos ha sido la metodología *in vivo* o la experimentación con animales. Como afirma Kabene y Baadel (2019) el valor de la vida animal está en el centro de los conflictos emocionales que surgen cuando los animales se convierten en sujetos experimentales en los campos médico y cosmético.

Aquellos que se oponen al uso de pruebas con animales para cosméticos creen que es indignante y cruel usar la vida animal por la simple razón de hacer que los humanos se vean mejor, y que los beneficios para los seres humanos no validan los daños causados a los animales. Por tales razones, el uso de animales para probar productos cosméticos está prohibido en la Unión Europea desde 2013 (Díez-Sales *et al.*, 2018).

Como tal, se están desarrollando nuevos enfoques para llenar el vacío dejado por este enfoque, una de esas estrategias es el enfoque *ex vivo*, que representa un modelo entre *in vitro* e *in vivo*, donde se pueden cultivar cortes de tejido completo. Y así, los procesos metabólicos representan más de cerca la situación que se observaría en la experimentación *in vivo* (Dusinka *et al.*, 2017). En el área cosmética hay que diferenciar dos aspectos principales de esta metodología; el primero es el origen de la muestra, que puede ser: humana, animal o sintética, y el segundo es el tipo de prueba al que se somete la muestra, que puede ser hecho para determinar sus propiedades bioactivas o capacidad de penetración.

Las muestras humanas se han obtenido de dos formas principales, la primera, superficialmente, mediante un método no invasivo como el decapado, utilizando cinta



adhesiva, del estrato córneo, la capa más externa de la piel. El segundo es la adquisición de explantes de piel humana residual, luego de cirugías más invasivas, como una mamoplastia, todo bajo consentimiento informado de los donantes (Ratz-Łyko *et al.*, 2012; Granger *et al.*, 2020).

Las muestras de animales pueden obtenerse como subproducto de los mataderos, y están enfocadas a aquellos animales cuya piel asemeja a la humana en su composición y anatomía, en su mayoría cerdos, como lo afirman Taofiq *et al.* (2019).

Finalmente, las muestras sintéticas se refieren a las nuevas tecnologías que se han introducido para diseñar y desarrollar modelos de piel biológica o artificial que imiten la estructura altamente compleja de la piel humana. Se pueden fabricar modelos complejos de piel humana mediante diversas técnicas, como liofilización, bioimpresión tridimensional (3-D), electrohilado y sistemas de microfluidos, etc. Ya se encuentran disponibles algunas opciones comerciales, incluido EpiSkin® (L 'Oreal, Francia), Epi-Derm® (MatTek Corporation, EE. UU.), SkinEthic® (SkinEthics, Francia), epiCS® (CellSystems, Alemania), Holoderm® (Kaloderm®, Phenion® (Henkel, Alemania) y NeoDerm® (Tegoscience, Corea) (Yun *et al.*, 2018; Pellevoisin *et al.*, 2018).

Una vez que se obtiene la muestra, la prueba puede comenzar, en el ámbito de las posibles propiedades bioactivas, por lo general, el experimento está diseñado para exponer la muestra a un factor de estrés, luz ultravioleta, contaminación, luz azul, humo de cigarrillo y ozono, así como un extracto o similar para probar su capacidad para proteger la muestra. Algunos ensayos para validar esa afirmación pueden ser ensayo de inhibición de colagenasa, espectrofotometría, birrefringencia e inmunotinción. Este tipo de estudios han sido realizados por y Francois-Newton *et al.* (2021), Granger *et al.* (2020), Ratz-Łyko *et al.* (2015) y Tubia *et al.* (2020).

Granger *et al.* (2020) combinaron explantes humanos, como muestras, con inmunotinción, técnica que permite la identificación y valoración de la distribución topográfica de los diferentes tipos de células cutáneas utilizando anticuerpos específicos contra el colágeno (Schaffer y Willerth, 2017), para validar la capacidad de una crema de noche que contiene melatonina, carnosina y extracto de *Helichrysum italicum* para el tratamiento del daño cutáneo y el foto envejecimiento. Los resultados de su experimento mostraron que la aplicación de crema de noche después de la exposición a los rayos UVA, la contaminación y los rayos infrarrojos redujeron significativamente el daño de la piel en los explantes causado por el estrés oxidativo.

Tubia *et al.* (2020) diseñaron un modelo *ex vivo* para evaluar la capacidad protectora de un compuesto de *Alteromonas macleodi* contra la contaminación del agua. Este modelo consistió en las hebras de cabello sano de un donante caucásico que se utilizaron para documentar el impacto del agua contaminada en la

estructura del cabello. Para evaluar su eficacia se utilizó la birrefringencia, que es un parámetro intrínseco de la muestra, dependiendo de su material y estructura. El retraso, sin embargo, también depende del grosor de la muestra, encontrando que el tratamiento previo del cabello con el compuesto (0.1 g / L) niega el efecto de la contaminación del agua y restaura la respuesta del cabello a la luz al compararse con el control, lo que demuestra el efecto protector del compuesto sobre la estructura global de la fibra de queratina.

Ratz-Łyko *et al.* (2015) probaron de manera similar las propiedades de una emulsión con extractos de residuos de semillas, utilizando como muestra el estrato córneo obtenido por el método de "tape stripping" emparejado con espectrofotometría. Esta técnica permite determinar las sustancias activas y la capacidad antioxidante en diferentes capas de la epidermis, utilizando la capacidad de los antioxidantes para neutralizar los radicales sintéticos. Descubriendo que la emulsión con extractos de residuos de semillas tiene actividad antioxidante y propiedades antiinflamatorias. Y se puede sugerir como una posible estrategia para prevenir y modular los daños oxidativos de la piel.

Y Francois-Newton *et al.* (2021) demostraron que aceite de sándalo indio funciona como ingrediente activo protector contra el efecto perjudicial de los estresores ambientales. Ellos evaluaron las propiedades antioxidantes y antienvjecimiento, y para lo anterior utilizaron explantes de piel contra diferentes factores de estrés con o sin el aceite y evaluaron el ensayo de inhibición de la colagenasa. La inhibición de esta enzima estaría relacionada con mantener cantidades adecuadas de colágeno y por ende mantener la apariencia sana de la piel.

Para evaluar la penetración de los principios activos que se utilizan en el tratamiento de distintas dolencias se requiere penetrar el estrato córneo, ya que ejercen sus efectos biológicos en los tejidos más profundos de la piel. El método validado para evaluar la permeabilidad cutánea se describe en la Guía de pruebas 428 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. Según este ensayo, la sustancia de prueba previamente colocada en un aparato de difusión se aplica sobre la superficie de la piel (células de Franz). Luego, la permeación de los componentes se analiza en el compartimento receptor, mediante cromatografía líquida de alta resolución o HPLC por sus siglas en inglés. Utilizando esta técnica se determinó la permeabilidad de una gran cantidad de compuestos de *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus* utilizando un modelo de piel de cerdo (Eberlin *et al.*, 2020). Ebada *et al.* (2021), Pillai *et al.* (2005), Sauce *et al.* (2021), Taofiq *et al.* (2019) y Westfall (2020).

CONCLUSIONES

La industria cosmética ha crecido de manera exponencial en la últimas décadas, este rápido crecimiento en parte es producto de la habilidad que poseen las compañías de adaptarse a los cambios y exigencias de los consumidores. Por lo que en los últimos años se han incorporado ingredientes de origen natural, eco-amigables y libres de crueldad animal, ya que son las condiciones más importantes impuestas por los compradores al momento de elegir un tratamiento cosmético. Lo anterior explica la constante demanda de nuevos productos de origen "natural", por lo que el descubrimiento de nuevos y/o mejores ingredientes con aplicaciones cosméticas es una de las áreas de mayor crecimiento en la investigación de productos naturales. En este sentido, uno de los grandes retos es garantizar la efectividad y seguridad, por lo tanto, las pruebas, especialmente de modelos *in vitro* e *in silico* se han convertido en herramientas rutinarias para la validación de los ingredientes de origen natural. Además, se espera que en un futuro se desarrolle una legislación encaminada al establecimiento de metodologías estandarizadas con la finalidad de regular los ingredientes cosméticos de origen "naturales".

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al PROVERICYT por dar la oportunidad de formar parte del XXIII Verano de Investigación Científica y Tecnológica de la UANL.





LITERATURA CITADA

- Abhijit, S., y D. Manjushree. 2010. Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia indica*. *International Journal of Botany*. 6(3): 299-303. <https://scialert.net/abstract/?doi=ijb.2010.299.303>
- Aburjai, T., y F.M. Natsheh. 2003. Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 17(9): 987-1000. <https://doi.org/10.1002/ptr.1363>
- Algiert-Zielińska, B.P. Mucha, y H. Rotsztein. 2019. Lactic and lactobionic acids as typically moisturizing compounds. *International journal of dermatology*. 58(3): 374-379. <https://doi.org/10.1111/ijd.14202>
- Ashawat, M.S., S. Saraf, y S. Saraf. 2006. Photo protective properties of *Boerhavia diffusa*. *Biosciences Biotech Research Asia*. 3(1): 257-60. https://www.researchgate.net/publication/289090365_Photo_protective_properties_of_Boerhavia_diffusa
- Bogdanov, S. 2016. Beeswax: History, Uses and Trade. *Bee Product Science*, 1-18. https://www.researchgate.net/publication/304012171_Beeswax_History_Uses_Trade
- Burlando, B., y L. Cornara. 2013. Honey in dermatology and skin care: a review. *Journal of cosmetic dermatology*. 12(4): 306-313. <https://doi.org/10.1111/jocd.12058>
- COSMOS-STANDARD. 2018. Cosmetics organic and natural standard. Brussels: European Cosmetics Standards Working Group. En: <https://cosmosstandard.files.wordpress.com/2018/08/cosmos-standard-v3-0.pdf> (consultado el: 30/06/2021).
- Deniz, F.S.S., R.E. Salmas, E. Emerce, I.I.T. Cankaya, H.S. Yusufoglu, y I.E. Orhan. 2020. Evaluation of collagenase, elastase and tyrosinase inhibitory activities of *Cotinus coggygia Scop.* through in vitro and in silico approaches. *South African Journal of Botany*. 132: 277-288. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.05.017>
- Díez-Sales, O.A. Nácher, M. Merino, y V. Merino. 2018. Alternative Methods to Animal Testing in Safety Evaluation of Cosmetic Products. Pp 551-584. En: Salvador, A., y A. Chisvert (Eds.). *Analysis of cosmetic products*. Elsevier. Valencia, España, 606pp.
- Dusinska, M., E. Rundén-Pran, J. Schnekenburger y J. Kanno. 2017. Toxicity tests: In vitro and In vivo. Pp 51-82. En: Fadeel, B., A. Pietroiusti, y A.A. Shvedova (Eds.). *Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health*. Academic Press. 468pp.
- Ebada, H.M., M.M. Nasra, Y.S. Elnaggar, y O.Y. Abdallah. 2021. Novel rhein-phospholipid complex targeting skin diseases: development, in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Drug Delivery and Translational Research*. 11(3): 1107-1118. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-020-00833-1>
- Eberlin, S., M.S.D. Silva, G. Facchini, G.H.D. Silva, A.L.T.A. Pinheiro, S. Eberlin, y A.D.S. Pinheiro. 2020. The ex vivo skin model as an alternative tool for the efficacy and safety evaluation of topical products. *Alternatives to Laboratory Animals*. 48(1): 10-22. <https://doi.org/10.1177/0261192920914193>
- Espinosa-Leal, C.A., y S. García-Lara. 2019. Current methods for the discovery of new active ingredients from natural products for cosmeceutical applications. *Planta medica*. 85(07): 535-551. <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/a-0857-6633>
- Fang, J., C. Liu, Q. Wang, P. Lin, y F. Cheng. 2018. In silico polypharmacology of natural products. *Briefings in bioinformatics*. 19(6): 1153-1171. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx045>
- FDA (U.S. Food and Drug Administration). 2021. Cosmetic Overview for Imported Products. En: <https://www.fda.gov/industry/regulated-products/cosmetics-overview> (consultado el 2/07/2021).
- Filimonov, D.A., A.A. Lagunin, T.A. Glorizova, A.V. Rudik, D.S. Druzhilovskii, P.V. Pogodin, y V.V. Poroikov. 2014. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 50(3): 444-457. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>
- Fong, P., H.H. Tong, y C.M. Chao. 2014. In silico prediction of tyrosinase and adenylyl cyclase inhibitors from natural compounds. *Natural product communications*. 9(2): 189-194. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900214>
- Fonseca-Santos, B., M.A. Corrêa, y M. Chorilli, M. 2015. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 51(1): 17-26. <https://www.scielo.br/j/bjps/a/TDpKrSLYxqM8yrJq5SwwjZH/?lang=en>
- Francois-Newton, V., A. Brown, P. Andres, M.B. Mandary, C. Weyers, M. Latouche-Veerapen, y D. Hettiarachchi. 2021. Antioxidant and Anti-Aging Potential of Indian Sandalwood Oil against Environmental Stressors In Vitro and Ex Vivo. *Cosmetics*. 8(2): 53-56. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020053>
- Granger, C., A. Brown, S. Aladren, y M. Narda. 2020. Night Cream Containing Melatonin, Carnosine and Helichrysum italicum Extract Helps Reduce Skin Reactivity and Signs of Photodamage: Ex Vivo and Clinical Studies. *Dermatology*

- and Therapy. 10(6): 1315-1329. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13555-020-00443-2>
- IBD.2019. Diretrizes para a certificação de produtos de saúde e beleza orgânicos e naturais e para matérias primas orgânicas e naturais. 6.ed. IBD Certifications, Botucatu, 52pp
- Kabene, S., y S. Baadel. 2019. Bioethics: a look at animal testing in medicine and cosmetics in the UK. *Journal of medical ethics and history of medicine*. 12(15):1-11. <https://doi.org/10.18502/jmehm.v12i15.1875>
- Kaur, C.D., y S. Saraf. 2011. Photochemoprotective activity of alcoholic extract of *Camellia sinensis*. *International journal of pharmacology*. 7(3): 400-404. <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2011.400.404>
- Khan, I.A., y E.A. Abourashed. 2011. *Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs and cosmetics*. John Wiley & Sons, Nueva Jersey, 845 pp.
- Mahesh, S.K., J. Fathima, y V.G. Veena. 2019. *Cosmetic potential of natural products: industrial applications*. Pp. 215-250. En: Swamy, M.K., y M.S. Akhtar (Eds.). *Natural Bio-Active Compounds: Volume 2: Chemistry, Pharmacology and Health Care Practices*. Springer Nature. Singapur, Singapur, 492pp.
- Meng, X.Y., H.X. Zhang, M. Mezei, y M. Cui. 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*. 7(2): 146-157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Ottman, J.A. 1993. *Green marketing challenges and opportunities for the new marketing age*. NTC Business Book, Nueva York, 188pp.
- Pangestuti, R., & S.K. Kim. 2015. An overview of phycocolloids: the principal commercial seaweed extracts. *Marine algae extracts: processes, products, and applications*. Pp. 319-330. En: Kim, S.K., y K. Chojnacka, (Eds.). *Marine algae extracts: processes, products, and applications*. John Wiley & Sons. Weinheim, Alemania, 784pp.
- Pellevoisin, C., C. Bouez, y J. Cotovio. 2018. *Cosmetic industry requirements regarding skin models for cosmetic testing*. Pp. 3-37. En: Marques A.P., R.P. Pirraco, M.T. Cerqueira y R.L. Reis (Eds.). *Skin Tissue Models*. Academic Press. Porto, Portugal, 472pp.
- Pillai, R., M. Redmond, y J. Röding. 2005. Anti-wrinkle therapy: Significant new findings in the non-invasive cosmetic treatment of skin wrinkles with beta-glucan. *International Journal of Cosmetic Science*, 27(5): 292-292. https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2005.00268_3.x
- Placines, C., V. Castañeda-Loaiza, M. João Rodrigues, C.G. Pereira, A. Stefanucci, A. Mollica, G. Zengin, E.J. Llorent-Martínez, P.C. Castilho, y L. Custódio. 2020. Phenolic profile, toxicity, enzyme inhibition, in silico studies, and antioxidant properties of *Cakile maritima* scop.(Brassicaceae) from southern Portugal. *Plants*. 9(2): 142-165. <https://doi.org/10.3390/plants9020142>
- Ratz-Lyko, A., J. Arct, K. Pytkowska, y S. Majewski. 2015. In vivo and ex vivo evaluation of cosmetic properties of seedcakes. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 17(2): 109-115. <https://doi.org/10.3109/14764172.2014.988726>
- Raunio, H. 2011. In silico toxicology–non-testing methods. *Frontiers in pharmacology*. 2(33): 33-41. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00033>
- Real Academia Nacional de Medicina de España. 2021. In vitro. En: https://www.ranm.es/recomendaciones-de-la-ranm-sobre-el-lenguaje-medico/1701-in-vitro-en-cursiva.html?fbclid=IwAR2_4-jbXXsMtbNLKS0Bnu2O5qFfhLwPZ23iC_D8BbcDs8YtSBy8lo5i1P8 (consultado el 01/07/2021).
- Rodrigues, F., M. de la Luz Cádiz-Gurrea, M.A. Nunes, D. Pinto, A.F. Vinha, I.B. Linares, M.B.P. Oliveira y A.S. Carretero. 2018. *Cosmetics*. Pp. 393-427. En: Galanakis, C.M. (Eds.). *Polyphenols: properties, recovery, and applications*. Woodhead Publishing. Viena, Austria, 438pp.
- Rodríguez-Sancan, G.E. 2019. Análisis de las tendencias del consumo en productos de cosmetología orgánica en guayaquil. Tesis de licenciatura, Facultad de Comunicación Social, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, 141pp.
- Rollinger, J.M., T. Langer, y H. Stuppner. 2006. Integrated in silico tools for exploiting the natural products' bioactivity. *Planta medica*. 72(08): 671-678. <https://doi.org/10.1055/s-2006-941506>
- Roy, A., R.K. Sahu, M. Matlam, V.K. Deshmukh, J. Dwivedi, y A.K. Jha. 2013. In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. *Pharmacognosy reviews*. 7(14): 97-106. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120507>
- Sabater, I.A., y L. Mourelle. 2013. *Cosmetología para estética y belleza*. McGraw-Hill España, Madrid, 20 pp.
- Sauce, R., C.A.S. de Oliveira Pinto, M.V.R. Velasco, C. Rosado y A.R. Baby. 2021. Ex vivo penetration analysis and anti-inflammatory efficacy of the association of ferulic acid and UV filters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 156: 105578- 105585. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105578>
- Schaffer, D., y S. Willerth. 2017. 5.8 Scaffold Materials for Human Embryonic Stem Cell Culture and Differentiation. Pp. 129-153. En: Ducheyne, P. (Eds.). *Comprehensive biomaterials II*. Elsevier. Pensilvania, Estados Unidos, 4858pp.
- Schoenfeld, P. 2020. *Colágeno: Rejuvenece tu piel, fortalece las articulaciones, y siéntete más joven gracias a la dieta que aumenta la producción y el consumo de colágeno*. Editorial Sirio Sa, Málaga, España.276 pp
- Taofiq, O., F. Rodrigues, L. Barros, M.F. Barreiro, I.C. Ferreira, y M.B.P. Oliveira. 2019. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and ex vivo skin permeation studies. *Food and Chemical Toxicology*. 127(2019): 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.045>
- Thring, T.S., P. Hili, y D.P. Naughton. 2009. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC complementary and alternative medicine*. 9(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-27>
- Torres H y X. Torres. 2005. Situación de la cosmetología y de la estética dentro de la dermatología. Evolución de la dermocosmética en los últimos 30 años. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*. 33(1): 1-5. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=5357>
- Tubia, C., A. Fernández-Botello, J. Dupont, E. Gómez, J. Desroches, J. Attia, y E. Loing. 2020. A New Ex Vivo Model to Evaluate the Hair Protective Effect of a Biomimetic Exopolysaccharide against Water Pollution. *Cosmetics*. 7(4): 78-90. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040078>
- USDA. 2008. National Organic Program. *Cosmetics, body care products, and personal care products*. En: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/OrganicCosmeticsFactSheet.pdf> (consultado en 30/06/2021).
- Varela, M.T., M. Ferrarini, V.G. Mercaldi, B. da Silva Sufi, G. Padovani, L.I.S. Nazato, y J.P.S. Fernandes. 2020. Coumaric acid derivatives as tyrosinase inhibitors: Efficacy studies through in silico, in vitro and ex vivo approaches. *Bioorganic Chemistry*. 103: 104-108. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104108>
- Westfall, A., G.T. Sigurdson, L.E. Rodriguez-Saona, y M.M. Giusti. 2020. Ex Vivo and in vivo assessment of the penetration of topically applied anthocyanins utilizing ATR-FTIR/PLS regression models and HPLC-PDA-MS. *Antioxidants*. 9(6): 486. <https://doi.org/10.3390/antiox9060486>
- Yun, Y.E., Y.J. Jung, Y.J. Choi, J.S. Choi, y Y.W. Cho. 2018. Artificial skin models for animal-free testing. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 48(2): 215-223. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40005-018-0389-1>