

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”)

Rosario Rojas^{1*}, Víctor Hugo Doroteo¹, Camilo Díaz¹, Abraham Vaisberg¹, Martín Neira¹, Cecilia Terry²

¹Universidad Peruana Cayetano Heredia; ²3QP SAC

*autor de correspondencia: Av. Honorio Delgado 430, SMP, Lima, PERU.

rosario.rojas@upch.pe

Resumen:

Con miras a desarrollar 2 cremas cosméticas a base de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Bixa orellana* (BO) y *Oenothera rosea* (OR), ambas muestras fueron sometidas a diversos tests químicos, enzimáticos, celulares e *in vivo*. Los extractos de BO y OR mostraron buena actividad antioxidante en los tests de DPPH (EC_{50} = 10.65 y 10.78 μ g/ml, respectivamente) y TEAC (0.52 y 0.2, respectivamente). BO y OR inhiben moderadamente la enzima elastasa (IC_{50} = 72.68 y 112.04 μ g/ml, respectivamente) y altamente la enzima colagenasa (IC_{50} = 166.23 y 194.89 μ g/ml, respectivamente). La toxicidad de BO y OR contra melanocitos B16 es baja (GI_{50} = 240.24 y 270.80 μ g/ml, respectivamente). Solamente el extracto de BO promueve la síntesis de colágeno *in vitro* (11.2% a c = 25 μ g/ml); mientras que solo el extracto de OR fue capaz de proteger a los fibroblastos contra los daños de la irradiación UV-B (24.5% a c = 25 μ g/ml). El contenido de compuestos fenólicos en los extractos de BO y OR fue 14.9 y 15.4 mg de ácido gálico/g extracto, respectivamente. El contenido de ácido ascórbico del extracto de OR (210.64 mg/100 g extracto) fue mayor que el de BO (136.63 mg/100 g extracto). En cuanto a los marcadores químicos, BO contiene 8.66 mg de ácido elágico/g extracto; mientras que el de OR contiene 2.39 mg de quercetina/g extracto. Se prepararon 2 cremas con cada uno de los extractos y se realizó el “Patch test” en 20 voluntarios sanos. Ninguno de los sujetos mostró algún tipo de efecto adverso cuando las cremas fueron aplicadas en forma tópica. Ambas cremas tuvieron resultados positivos en la evaluación subjetiva de eficacia reportada por los voluntarios y disminuyeron, en mayor proporción que el placebo, la profundidad de arrugas medida por el equipo Skin Diagnosis System.

Palabras clave: *Bixa orellana*, *Oenothera rosea*, síntesis colágeno, anti-UVB

Introducción:

Actualmente la industria global de productos cosméticos demanda y está en la búsqueda constante de nuevos ingredientes naturales, especialmente con propiedades anti-edad. La biodiversidad peruana tiene un gran potencial para ofrecer a este mercado; sin embargo, hasta el momento son pocos los estudios científicos realizados sobre plantas peruanas que demuestren la seguridad de su uso, o su eficacia en el tratamiento para retardar el envejecimiento de la piel.

Luego de un screening de actividad antioxidante y antienzimática de 12 extractos de plantas peruanas realizado por nuestro grupo de investigación, se encontró que los extractos más activos fueron los de *Bixa orellana* (“Achiote”) y *Oenothera rosea* (“Chupasangre”). Ambas plantas son usadas extensamente en la medicina popular peruana; por ejemplo, Brack¹ y Alarco de Zabria² reportan que las hojas de Achiote son usadas tradicionalmente en forma de macerado acuoso o en cataplasma para cicatrizar heridas, como emplasto en infecciones de la piel y como antiséptico vaginal por medio de lavados con la maceración acuosa. Asimismo, mencionan que la planta Chupasangre es muy usada en forma de cataplasma para el tratamiento de heridas, golpes y hematomas.

Con el objetivo de determinar el potencial de los extractos hidroalcohólicos de Achiote y Chupasangre como ingredientes naturales para la industria cosmética, o para su desarrollo como fitocosméticos que retarden el envejecimiento de la piel, se realizó un estudio detallado sobre estas dos plantas que incluyen ensayos de actividad antioxidante, anticolagenasa, antielastasa, actividad fotoprotectora contra rayos UV-B, actividad promotora de la síntesis de colágeno y citotoxicidad; así como la determinación del contenidos de compuestos antioxidantes y de marcadores químicos específicos que permitan la estandarización química de los extractos crudos. Luego se prepararon cremas a base de esos extractos para determinar la seguridad de su uso por vía tópica por medio del test de parche (“Patch test”) y su eficacia en el tratamiento de la piel del rostro, la cual fue evaluada (ensayos doble ciego contra placebo) en forma subjetiva por los mismos sujetos voluntarios y en forma objetiva por la evaluación clínica de un médico dermatólogo.

Con el presente estudio se espera contribuir hacia el desarrollo de la industria de ingredientes naturales y de fitocosméticos a base de plantas de la biodiversidad peruana.

Objetivos:

Determinar las propiedades antioxidantes, antienzimáticas, fotoprotectoras, promotoras de síntesis de colágeno; así como la seguridad y eficacia de extractos de Achiote (*Bixa orellana*) y Chupasangre (*Oenothera rosea*) con miras al desarrollo de ingredientes naturales y fitocosméticos con propiedades antiedad.

Materiales y Métodos:

Muestra vegetales. Se colectó hojas de *Bixa orellana* (BO) y *Oenothera rosea* (OR). Las muestras vegetales fueron colectadas e identificadas por el biólogo Camilo Díaz. Las respectivas muestras botánicas fueron depositadas en el HEPLAME (Herbario de Plantas Medicinales, Sección de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia).

Preparación de extractos. Las muestras vegetales secas y molidas fueron extraídas con una mezcla de etanol y agua destilada (7:3) por 4 días a temperatura ambiente. Luego de la filtración, se procedió a evaporar el solvente

en un rotaevaporador a temperatura menor de 40 °C. Los extractos hidroalcohólicos obtenidos fueron almacenados en la refrigeradora a temperatura menor de 4 °C hasta su uso.

Determinación de compuestos fenólicos: Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por García et al.³ Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 1-5 mg/L. Los extractos hidroalcohólicos de las 2 muestras vegetales fueron evaluados a una concentración de 0.1 mg/mL. A 100 µL de la muestra se le añadió 250 µL de la solución de Folin-Ciocalteu (diluido 1 en 2 con agua milli-Q), se sonicó por 5 min, luego se le añadió 1250 µL de carbonato de sodio al 20% y 400 µL de agua ultra pura. Se agitó vigorosamente, se cubrió de la luz y se le llevó a reposo por 90 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro. Las muestras fueron analizadas por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/g de extracto hidroalcohólico.

Contenido de ácido ascórbico. El contenido de ácido ascórbico fue determinado de acuerdo al método descrito por Lung et al.⁴ Se extrajeron 20 mg del extracto hidroalcohólico con 2 mL de ácido metafosfórico al 1% por 45 minutos a temperatura ambiente, al cabo de ese tiempo se filtró. Se tomó 100 µL de la solución anterior y se le agregó 900 µL de una solución de 2,6-dicloroindofenol (cuya absorbancia estaba entre 0.30 y 0.35 para asegurar que la lectura de la muestra se encuentre dentro del rango de las de los estándares), luego de 1 minuto se midió la absorbancia a 515 nm. El contenido de ácido ascórbico se determinó a partir de la recta de regresión obtenida con el ácido ascórbico estándar en las concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Actividad antioxidante en el test de DPPH. Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos mediante el método de Mensor et al.⁵ Se prepararon diluciones en etanol acuoso de los extractos hidroalcohólicos hasta obtener concentraciones de 0.0 a 150.0 µg/mL. Se mezcló 1.0 ml de cada una de las diluciones con 0.5 ml de una solución 0.3 mM de DPPH en etanol y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 30 minutos, al término de los cuales se procedió a medir la absorbancia de la mezcla a 517 nm. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Antioxidante (\%)} = \left(\frac{AC - AM - AB}{AC} \right) \times 100\%$$

donde:

AM es la absorbancia de la muestra + DPPH

AB es la absorbancia del blanco (muestra + etanol)

AC es la absorbancia del blanco del reactivo (DPPH + etanol)

La concentración del extracto hidroalcohólico que neutraliza al 50 por ciento de los radicales de DPPH (EC₅₀, concentración efectiva media) fue obtenida a partir de la recta del porcentaje de actividad antioxidante versus la concentración de la muestra (µg/mL).

Actividad antioxidante total (TEAC). La capacidad antioxidante se determinó siguiendo el método descrito por Hazra et al.⁶ El radical ABTS⁺ fue generado al mezclar un volumen de solución 14 mM de ABTS con un volumen de la solución 4.9 mM de persulfato de sodio, seguido de incubación por 16 h en oscuridad. La solución del radical ABTS se diluyó con agua hasta obtener una absorbancia de 0.70 (± 0.2). Se mezcló 10 µL de los extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones (0.05 a 10 mg/mL) con 1.0 mL de la solución de radical ABTS y se leyó la absorbancia luego de 6 minutos a una longitud de onda de 734 nm. Se procedió de igual manera para medir la actividad antioxidante del estándar Trolox. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado.

Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante total (% AAT) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AAT} = (A_0 - A_m) \times 100$$

Donde:

% AAT= Porcentaje de Actividad antioxidante total

A₀ = Absorbancia del control

A_m = Absorbancia de la muestra con ABTS – Absorbancia del blanco de la muestra

El blanco consistió de la mezcla de 10 µL del extracto hidroalcohólico con 1.0 mL de agua destilada. El control consistió de la mezcla de 10 µL de etanol con 1.0 mL de la solución de radical ABTS.

Se calculó el porcentaje de inhibición de la formación de radicales ABTS y se graficó como una función de la concentración. Finalmente se determinó el TEAC (Trolox equivalent antioxidant concentration) dividiendo la pendiente de la gráfica de la muestra (extracto hidroalcohólico) sobre la pendiente de la gráfica para el estándar Trolox.

Inhibición de enzima elastasa: El ensayo se llevó a cabo usando el método descrito por Thring et al.⁷ y consistió en incubar 25 µL de muestra (a las concentraciones finales de 5, 65, 125, 180 y 250 µg/mL) con 100 µL de la enzima elastasa pancreática porcina (PE, 2.5 µg/mL en agua HPLC) por 15 minutos y luego agregar 125 µL del sustrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAPVN, 1.6 mM en buffer THAM, Sigma 7-9[®], pH 8.0) para que la reacción se inicie. Luego de 11 minutos se midió la absorbancia a 410 nm usando una lectora de placas multifunción CHAMELEON V. Se realizó un control sin muestra y se utilizó galato de epigallocatequina (EGCG) como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición de la enzima elastasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición elastasa} = (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_m) \times 100 / \text{Abs}_0$$

Donde:

Abs_0 = Absorbancia del control (sin muestra)

Abs_m = Abs. de la mezcla con sustrato – Abs. de la mezcla sin sustrato

Las EC_{50} (Concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa está representada por las concentraciones de los extractos y la ordenada por el promedio de porcentaje de actividad antioxidante obtenido a partir de tres mediciones independientes.

Inhibición de enzima colagenasa: El ensayo se llevó a cabo usando el método descrito por Thring et al.⁷ y consistió en incubar 100 μL de muestra (a las concentraciones finales de 80, 160 y 250 $\mu\text{g/mL}$) con 260 μL de la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* (ChC, 1.54 unidades/mL en buffer pH 7.5 de Tricine (N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina)) 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl_2) por 15 minutos y luego se agregó 240 μL del sustrato N-[3-(2-furil) acriloil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, 2 mM en buffer pH 7.5 de Tricine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl_2) para que la reacción se inicie. Luego de 5 minutos se midió la absorbancia a 348 nm usando un espectrofotómetro UV-Visible. Se realizó un control sin muestra y se utilizó galato de epigallocatequina (EGCG) como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de colagenasa} = (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_m) \times 100 / \text{Abs}_0$$

Donde:

Abs_0 = Absorbancia del control (sin muestra)

Abs_m = Abs. de la mezcla con sustrato – Abs. de la mezcla sin sustrato

Las EC_{50} (Concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa está representada por las concentraciones de los extractos y la ordenada por el promedio de porcentaje de actividad antioxidante obtenido a partir de tres mediciones independientes.

Inhibición de daño celular por radiación Ultravioleta: Los fibroblastos BALB/c 3T3 fueron cultivados en medio de crecimiento Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mmol/L glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomina a 37 °C bajo atmósfera húmeda con 5% CO_2 . Los fibroblastos fueron cultivados hasta llegar a un nivel de confluencia de 90-95% en placas de 24 pozos. El medio de crecimiento fue reemplazado 24 horas antes de agregar los extractos por DMEM conteniendo 0.1% FBS, 2 mmol/L glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomina. Para el experimento se utilizó una lámpara de luz UV-B de longitud de onda máxima = 312 nm (sin emisión UV-A ni UV-C). Las células fueron pre-tratadas con el extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones por espacio de 4 horas, al cabo de las

cuales fueron irradiadas con la luz UV-B por espacio de 90 segundos y con la lámpara UV a una altura de 20 cm. Justo antes de exponer las células a la radiación UV, las monocapas fueron lavadas con solución buffer fosfato salino (PBS) y expuestas en presencia de PBS. Luego de la irradiación, el PBS fue remplazado por DMEM conteniendo 1 % FBS, 2 mmol/L glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Las células fueron incubadas nuevamente por 24 horas al término de las cuales se cuantificó la viabilidad de las células por medio del cambio de color del reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), medido a la longitud de onda = 570 nm.⁸

Citotoxicidad: La citotoxicidad de los extractos fue evaluada en las líneas celulares de fibroblastos BALB/c 3T3 y en Melanocitos B16. Para este fin, las células fueron inoculadas en placas de cultivo de células de 96 pozos e incubadas a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95% aire por 24 h para permitir que las células se fijen a las placas.

Una placa conteniendo cada una de las líneas celulares fue fijada in situ con ácido tricloroacético (TCA) para obtener luego los valores de las células a tiempo cero, antes de añadir los extractos.

Luego, las placas recibieron diluciones seriadas del extracto en estudio o del solvente utilizado (DMSO), e incubadas por 48 horas adicionales. El ensayo fue detenido añadiendo TCA a las placas. Las células fijadas con el TCA fueron teñidas por 20 minutos con una solución de SRB al 0.4% en ácido acético al 1%. El SRB no unido a proteínas fue removido lavando con ácido acético al 1%.

Luego de secar las placas, el SRB unido a las proteínas fue solubilizado con una solución 10 mM de Tris base (pH 10.5) y la absorbancia leída a 550 nm en una lectora de micro placas. El valor del GI₅₀ (concentración del extracto que inhibe en un 50% el crecimiento de las células) fue determinado a partir del análisis de la regresión lineal.

Promoción de síntesis de colágeno: El ensayo de síntesis de colágeno tipo I fue llevado a cabo por medio de un ensayo inmuno-enzimático, de acuerdo a Kim et al.⁹ Se inocularon los fibroblastos 3T3 en placas de 24 pozos (5 x 10⁵ células/pozo) y se cultivó por 24 horas, al cabo de las cuales, el medio de cultivo fue cambiado por medio libre de suero IMDM (medio Dulbecco modificado por Iscove) y se cultivó por 24 horas más. Las células del grupo control fueron cultivadas en ausencia del extracto de planta. Luego del periodo de cultivo de las células, se colectó el sobrenadante de cada pozo y se midió la concentración de procolágeno tipo I con el kit de inmunoensayo Procollagen Type I C-Peptide (Takara Bio, Japón).

HPLC de extractos: Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) Elite LaChrom: bomba L-2130, detector DAD L-2455, columna analítica Purospher® STAR RP-18e, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm. Sistema de elución A: ácido fórmico al 4.5%, y B: acetonitrilo con gradiente acetonitrilo (de 0 a 15% de B en 40 minutos, a 45% en 45 minutos y a 100% de B en 5 minutos). El flujo fue de 0.5 mL/min. Volumen de inyección: 10 µL. Temperatura ambiente y detección a longitud de onda de 254 nm.

Se pesó 15 mg de extracto de planta en 5 mL de metanol al 80% en agua, se disolvió la muestra con ayuda de ultrasonido por 10 minutos y se pasó la solución a través de un filtro de 0.45 µm. Para el análisis cualitativo de los extractos se pasó por la columna HPLC el extracto problema junto con una mezcla de estándares (catequina, ácido clorogénico, epicatequina, galato de epigallocatequina, ácido cafeico, rutina, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido abscísico, quercetina, ácido cinámico y kaempferol; todos de Sigma-Aldrich) en metanol al 80%. Al confirmarse la presencia de ácido elágico en el extracto de Achiote y de quercetina en el de Chupasangre, se procedió a usar dichos compuestos para la estandarización de los extractos por medio de las curvas de calibración respectivas..

Pruebas de Seguridad (“Patch test”): Se evaluó el potencial irritativo, en 20 voluntarios humanos sanos, de la aplicación tópica y en dosis única de cremas cosméticas que contenían extracto hidroalcohólico al 5% de Chuapasangre o de Achiote. El vehículo de las cremas fue preparado como una emulsión de aceite en agua, donde la fase oleosa estaba compuesta por escualeno, di-n-octilcarbonato y acetato de Vitamina E; mientras que la fase acuosa estaba compuesta por glicerina y el extracto hidroalcohólico de la planta a evaluar. Tanto las cremas conteniendo los extractos, como el vehículo o crema base, fueron aplicados en la parte superior del brazo derecho de los voluntarios mediante el uso de un disco de aluminio de 7 mm de diámetro (Finn Chamber, Epitest Ltd., Finland). La cantidad aplicada fue la suficiente para llenar la cámara del disco de aluminio, que luego fue sujetado con una tela de algodón afieltrada de 1 x 1 cm para cubrir la superficie; estos parches se fijaron con esparadrapo antialérgico (Micropore, 3M). La misma persona (médico dermatólogo) evaluó a todos los voluntarios a las 4, 24 y 48 h para registrar la aparición de algún efecto adverso, el cual fue cuantificado usando una escala de gravedad de grado 0-4 (0: No reacción; 0.5: Reacción dudosa; 1: Reacción débil; 2: Reacción moderada; 3: Reacción fuerte; 4: Reacción severa). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Médica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Pruebas de eficacia: En este estudio participaron 30 voluntarios sanos que recibieron cada uno al azar una de las 3 cremas (“Achiote” al 1%, “chupasangre” al 1% o placebo). Las 3 cremas eran indistinguibles tanto para los voluntarios, como para el médico evaluador. Los voluntarios firmaron un consentimiento informado antes de ingresar al estudio y luego recibieron instrucciones para aplicarse las cremas en el rostro en la mañana y en la noche por un lapso de 28 días. La evaluación de eficacia fue realizada por un dermatólogo a los 0, 14 y 28 días de tratamiento. Las principales variables evaluadas fueron hidratación, homogeneidad, manchas y profundidad de arrugas. Asimismo, cada uno de los voluntarios contestó una encuesta de autoevaluación de 20 preguntas, donde se les interrogó principalmente por el nivel de aceptación y de eficacia de las cremas. La evaluación cuantitativa de la profundidad de las arrugas en la región periorbicular se obtuvo mediante el equipo Skin Diagnosis System (Aramo SG). Los resultados obtenidos para las cremas conteniendo los extractos de plantas fueron comparados con los del placebo (vehículo).

Resultados y Discusión:

La actividad antioxidante de los extractos de Achiote y Chupasangre en el ensayo de DPPH es muy alta, llegando a tener concentraciones efectivas medias muy cercanas a las del control positivo (rutina). La capacidad antioxidante total (TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity) del extracto de achiote fue 2.5 mayor que la de chupasangre, aunque no es tan alta como la del trolox (Tabla 1).

Tabla 1: Actividad antioxidante *in vitro* de extractos de Achiote y Chupasangre

Muestra	DPPH EC ₅₀ (µg/ml)	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)
Rutina (Control positivo)	6.43 ± 0.22	-----
Achiote	10.65 ± 0.48	0.52 ± 0.01
Chupasangre	10.78 ± 0.05	0.20 ± 0.01

A partir de los 40 años de edad empieza a disminuir drásticamente la elasticidad de la piel, principalmente debido a la acción de la enzima elastasa, dando como resultado la aparición de arrugas.¹⁰ Para mantener la elasticidad de la piel es importante prevenir la reducción no solo de la proteína elastina, sino también la del colágeno, disminuyendo su destrucción por la enzima colagenasa. El descubrimiento de extractos o compuestos que inhiban estas enzimas podrían ser usados eficazmente en tratamientos antienvjecimiento.¹¹ Nosotros encontramos que el extracto de Achiote sería un buen candidato para tratamientos antiedad ya que, si bien inhibe moderadamente a la enzima elastasa, es más eficaz que el control positivo epigalocatequinagalato (EGCG) en inhibir a la enzima colagenasa (Tabla 2).

Tabla 2. Inhibición de enzimas elastasa y colagenasa de extractos de Achiote y Chupasangre

Muestra	Elastasa IC ₅₀ (µg/mL)	Colagenasa IC ₅₀ (µg/mL)
EGCG	10.34 ± 0.68	321.41 ± 10.65
Achiote	72.68 ± 3.91	166.23 ± 5.3
Chupasangre	112.04 ± 4.73	194.89 ± 8.6

Si bien ambos extractos de plantas muestran buena actividad antioxidante y antienzimática *in vitro*, es preciso saber su grado de toxicidad, primero a nivel de células de la piel. La

toxicidad del extracto de Achiote y de Chupasangre contra los melanocitos B16, medida por la concentración necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50%, es relativamente baja (GI_{50} = 240.24 y 270.80 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Sin embargo, a concentraciones mayores de 200 $\mu\text{g/ml}$, los extractos son tóxicos contra los fibroblastos 3T3. Por tal motivo, se decidió evaluar las actividades biológicas de los extractos en fibroblastos solamente a la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$.

A dicha concentración, el extracto de Achiote promueve la síntesis de colágeno *in vitro* (11.2% con respecto a las células sin tratamiento); mientras que solo el extracto de Chupasangre fue capaz de proteger a los fibroblastos contra los daños de la irradiación UV-B (24.5% con respecto a las células no tratadas). Estos resultados, si bien auspiciosos, deben ser tomados como preliminares; por lo que ambos extractos serán reevaluados en otros modelos experimentales para corroborar su actividad fotoprotectora y promotora de regeneración de la piel.

El contenido de ácido ascórbico del extracto de Chupasangre es mucho mayor que el del extracto de Achiote; mientras que ambos extractos poseen similar contenido de compuestos fenólicos (Tabla 3). La presencia de estos compuestos antioxidantes podría explicar la gran actividad antiradicalaria hallada para ambos extractos, especialmente en el ensayo de DPPH.

Tabla 3: Contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico en Achiote y Chupasangre

Extractos	Compuestos fenólicos (mg ác. gálico /g extracto)	Contenido Ácido ascórbico (mg/100 g extracto)
Achiote	14.9 \pm 0.03	136.63 \pm 5.97
Chupasangre	15.4 \pm 0.04	210.64 \pm 13.00

En la figura 1 se muestra el perfil cromatográfico por HPLC del extracto hidroalcohólico de Chupasangre. Al pasar una mezcla de 12 estándares químicos junto con el extracto se pudo comprobar que de estos compuestos, solo se detectó la presencia de quercetina (t_R = 15.41 min) en el extracto de dicha planta.

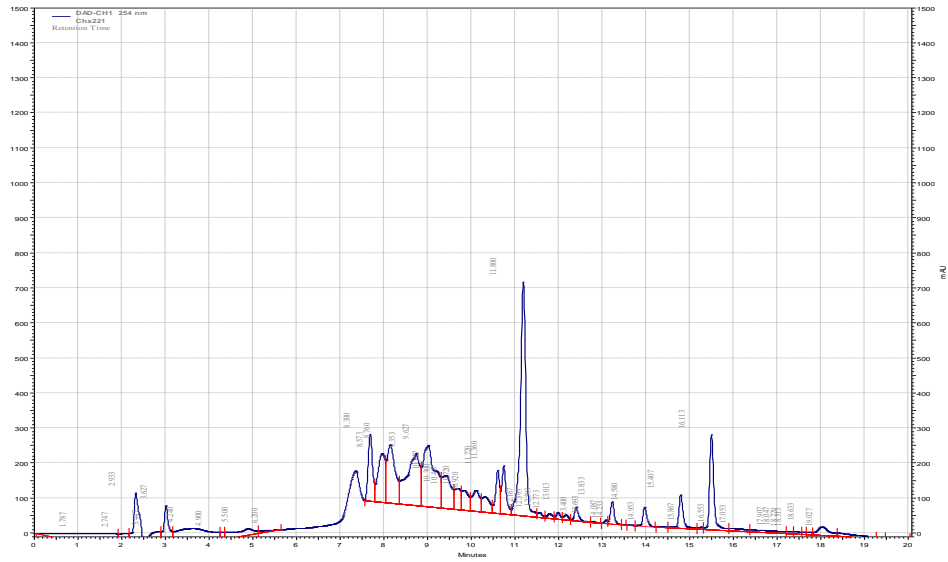


Figura 1. Cromatograma HPLC del extracto hidroalcohólico de Chupasangre

Con ayuda de la curva de calibración de quercetina (Figura 2) se pudo determinar que la concentración de este compuesto en la muestra de Chupasangre fue 2.39 ± 0.13 mg/g de extracto.

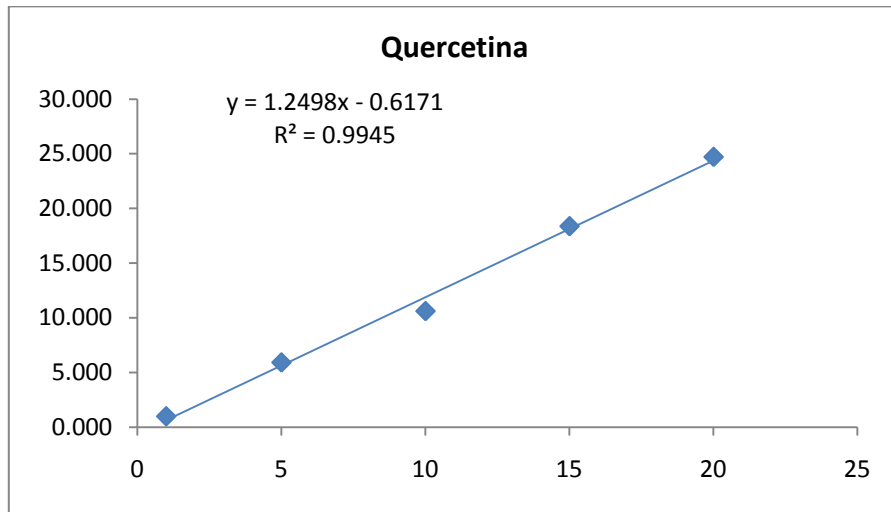


Figura 2. Curva de calibración para quercetina

Similarmente, en la Figura 3 se muestra el perfil cromatográfico por HPLC del extracto de Achiote. Por medio de la curva de calibración de ácido elágico ($t_R = 11.77$ min) se determinó que el contenido de este compuesto en la muestra de Achiote fue de 8.66 ± 0.17 mg/g de extracto (Figura 4).

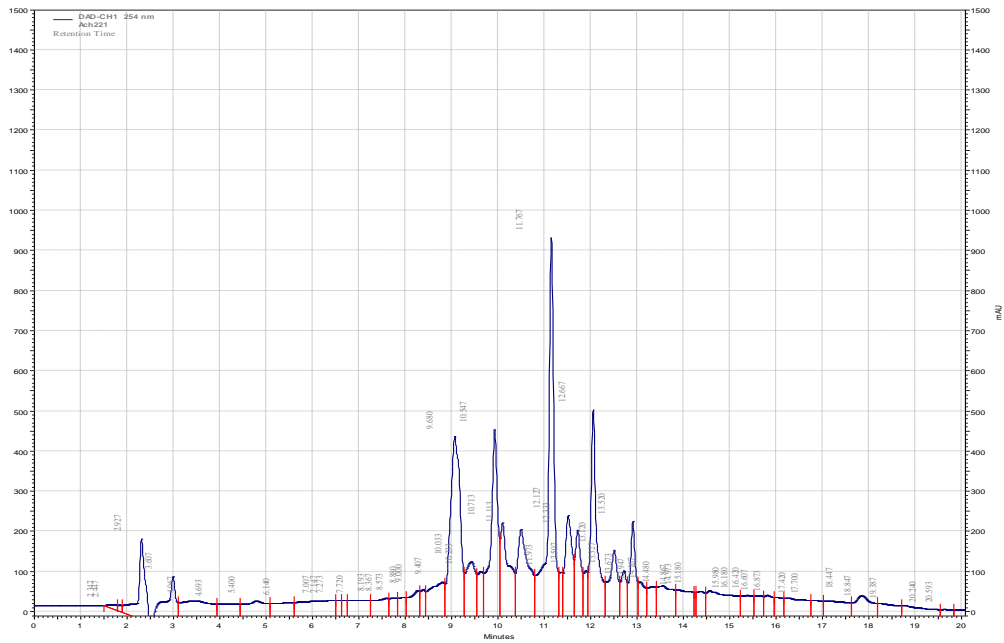


Figura 3.- Cromatograma HPLC de extracto hidroalcohólico de Achote

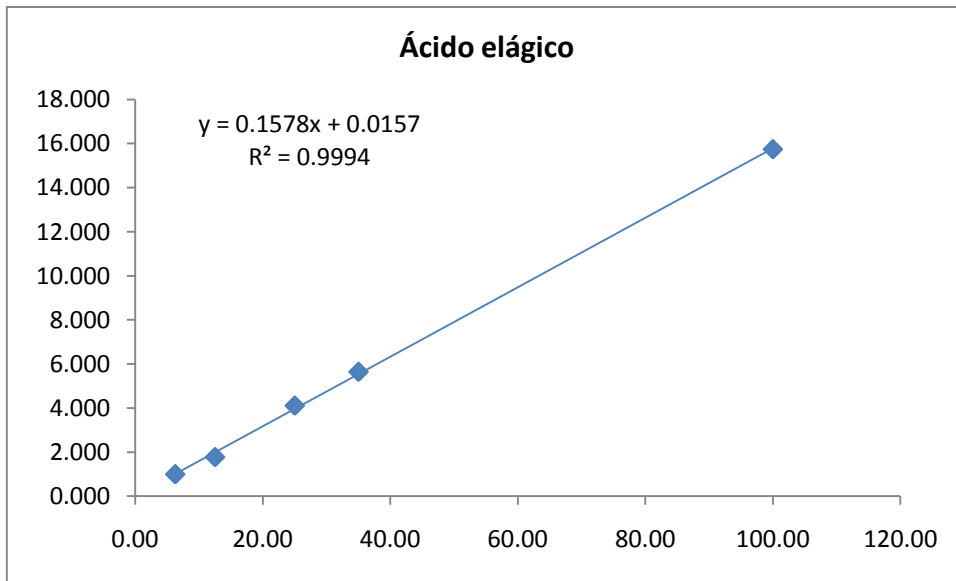


Figura 4. Curva de calibración para ácido elágico

Se prepararon 2 cremas con cada uno de los extractos, de tal manera que sean indistinguibles con una crema placebo, y se realizó el “Patch test” en 20 voluntarios sanos.

Ninguno de los sujetos mostró algún tipo de efecto adverso a las 4, 24 ó 48 horas de la aplicación de las cremas en forma tópica (Figuras 5 y 6).

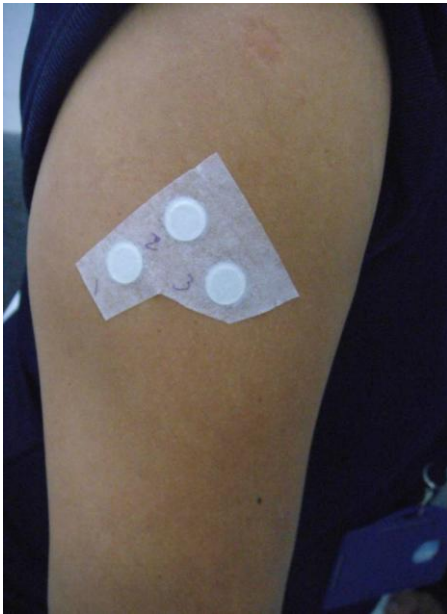


Figura 5. Finn Chambers con las 3 cremas (Achiote, Chupasangre y Placebo)



Figura 6. Ausencia de efectos adversos a las 48 horas

Para evaluar la eficacia de los extractos se realizó, en un total de 30 sujetos voluntarios, un ensayo doble ciego, randomizado, comparado contra placebo. El ensayo tuvo una duración total de 28 días, durante los cuales, los voluntarios se aplicaron las cremas en el rostro en la mañana y en la noche.

Para la evaluación subjetiva de eficacia, los voluntarios llenaron una encuesta al inicio y al final del experimento, con el fin de comparar los principales cambios en la piel. En la Figura 7 se puede observar que tanto para la crema de Achiote como para la de Chupasangre, los voluntarios manifestaron mejoras en diversas características de la piel (hidratación, suavidad, disminución de arrugas, estado general) que son mucho mayores que las manifestadas para el placebo.

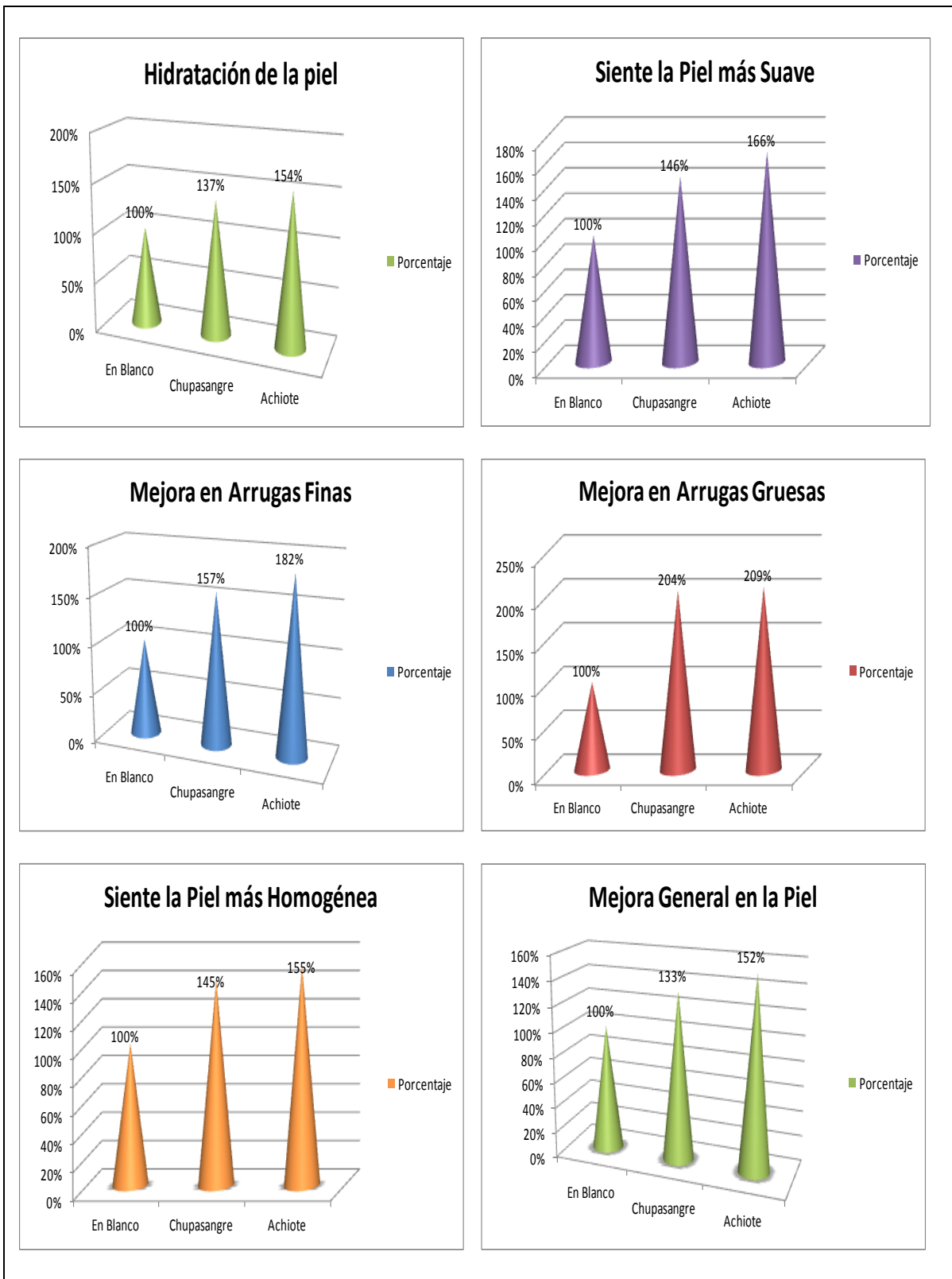


Figura 7. Resultados de la evaluación subjetiva de las cremas de Achiote y Chupasangre en comparación con el placebo (vehículo)

La eficacia percibida por los voluntarios para cada uno de los extractos coincide en su mayor parte con aquella determinada por el dermatólogo por medio de la evaluación clínica; sobre todo en lo que concierne a disminución de arrugas y estado general de la piel (Figura 8). Comparando el estado inicial con el final, el dermatólogo percibió una mejoría de la contextura general de la piel de hasta 23% para los voluntarios que usaron las cremas de Achiote y Chupasangre y solo de un 10% para los que recibieron placebo.

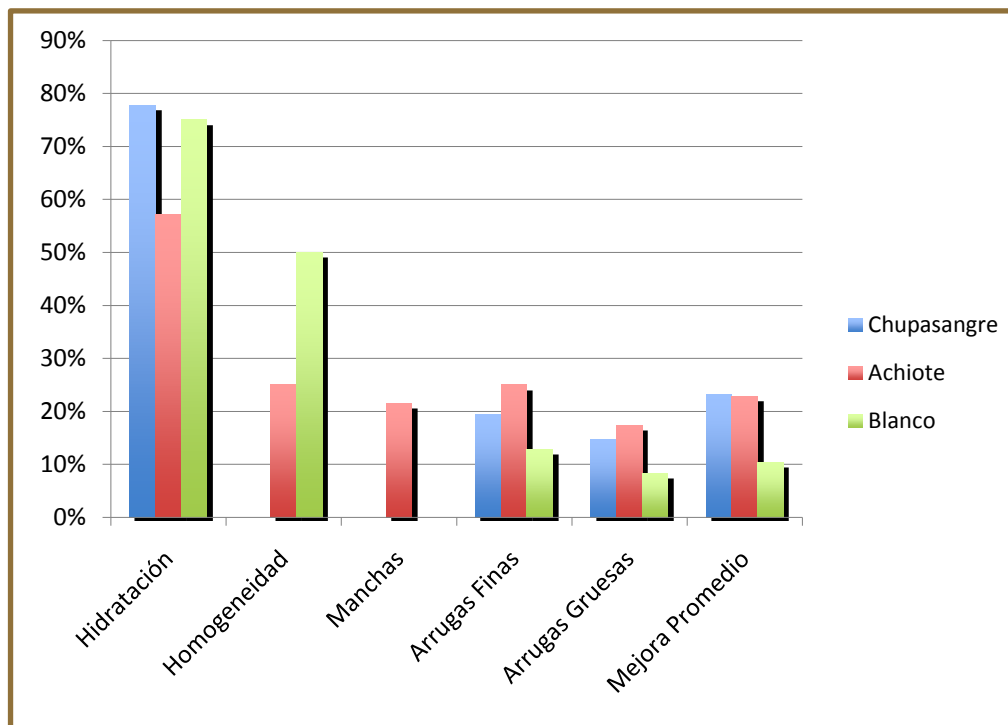


Figura 8. Evaluación clínica del efecto de extractos de Achiote y Chupasangre en comparación con el placebo

Para la prueba final de eficacia, el dermatólogo midió la profundidad de las arrugas a los 0 y 28 días del ensayo por medio del equipo Skin Diagnosis System (Aramo SG). En forma objetiva se pudo determinar que la crema a base de Chupasangre (n=10 voluntarios) disminuye la profundidad de las arrugas en un 27%, la crema de Achiote (n= 8 personas) 21% y la de placebo (n= 7 voluntarios) solo 4% (Figura 9).

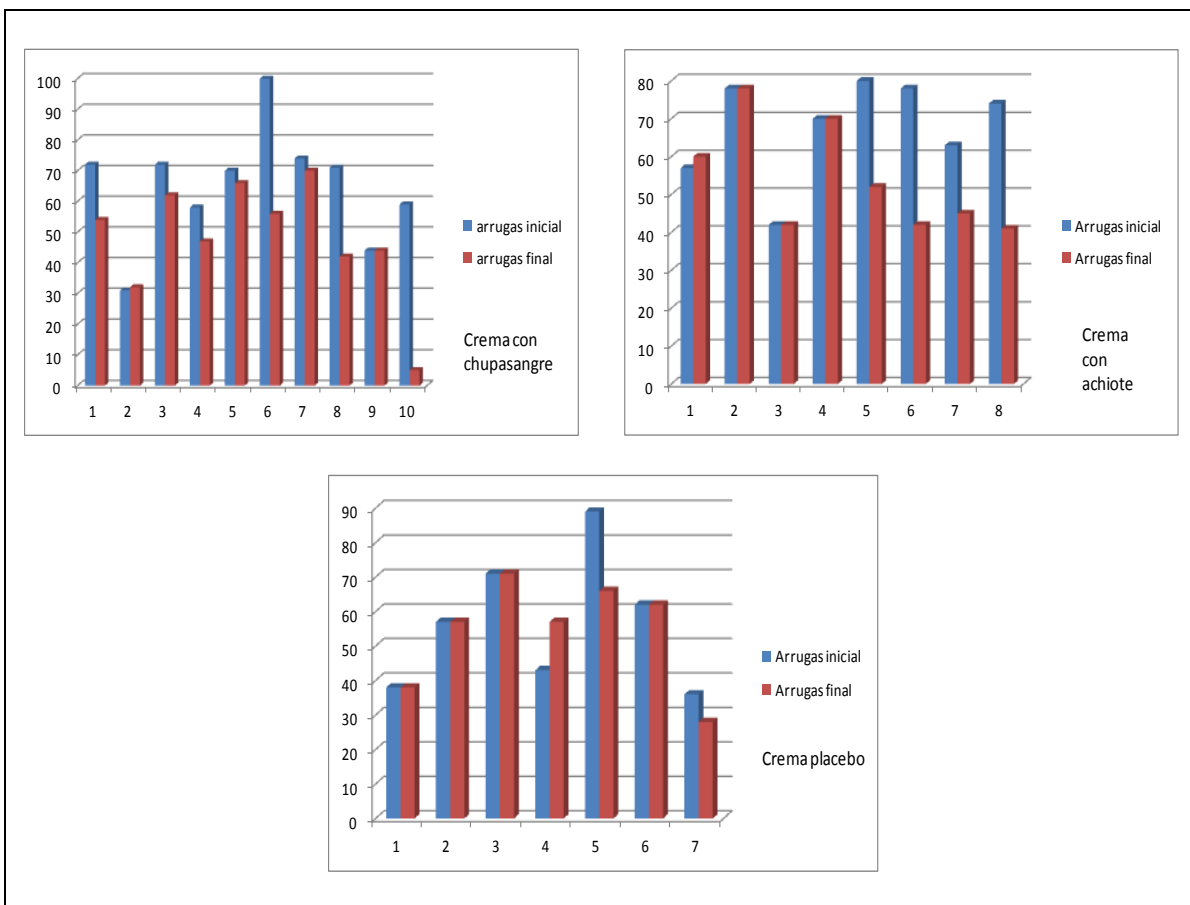


Figura 9. Efecto del tratamiento con Chupasangre, Achioté y Placebo en la profundidad de las arrugas medidas al inicio y final del ensayo con el Skin Diagnosis System

Tanto la evaluación subjetiva como objetiva de la eficacia de las cremas a base de Achioté y Chupasangre, realizadas en un ensayo doble ciego, sugieren que su uso mejora considerablemente el aspecto de la piel en comparación con el placebo; sin embargo, es de notar que el presente estudio fue realizado en un número pequeño de sujetos voluntarios, por lo que sería recomendable iniciar estudios complementarios en una muestra de mayor tamaño para poder obtener resultados concluyentes.

Conclusiones

Los extractos de Achioté y Chupasangre poseen buena actividad antioxidante *in vitro*, inhiben moderadamente la enzima elastasa y altamente la enzima colagenasa. El extracto de Achioté promueve la síntesis de colágeno, mientras que el de Chupasangre tiene actividad protectora contra la radiación UV-B. Ambos extractos muestran baja toxicidad contra melanocitos B16, aunque pueden ser tóxicos contra los fibroblastos a concentraciones mayores a 100 µg/ml. Ninguno de los extractos produjo efectos adversos cuando fue aplicado en forma tópica (Patch test) en la piel de voluntarios sanos. La pruebas subjetivas

y objetivas de eficacia sugieren que las cremas a base Achiote y Chupasangre mejoran el estado general de la piel y disminuyen la profundidad de las arrugas con mayor eficacia que la crema placebo.

Agradecimientos

El presente trabajo fue llevado a cabo gracias al auspicio del FIDECOM-Innovate Perú (Proyecto 148-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2010: Desarrollo y validación científica de ingredientes naturales basados en plantas medicinales y/o alimenticias de la biodiversidad peruana para la industria cosmética).

Referencias Bibliográficas:

1. Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. PNUD, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco, 1999. 556 pp.
2. Alarco de Zabria A. Perú, el libro de las plantas mágicas. 2da Ed. CONCYTEC. Lima, 2000. 311 pp.
3. García Nava M.J. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_IUAQGarciaNava.pdf.
4. Lung, M-Y., Chang, Y-C. Antioxidant properties of the edible Basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 6367.
5. Mensor, L., Menezes, F., Leitao, G., Reis, A., Santos, T., Coube, C., Leitao, S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 127.
6. Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement. Altern. Med.* **2008**, *8*, 63.
7. Thring, T.S.A., Hili, P., Naughton, D.P. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **2009**, *9*, 27.
8. Bae, J-Y., Choi, J-S., Kang, S-W., Lee, Y-J., Park, J., Kang, Y-H. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, e182.
9. Kim YH, Chung CB, Kim JG, Ko KI, Park SH, Kim J-H, Eom SY, Kim YS, Hwang Y-I, Kim KH. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, *72*, 303-311.
10. Mori M, Ikeda N, Kato Y, Minamino M, Watabe K. Inhibition of elastase activity by essential oils *in vitro*. *J. Cosmetic Dermatol.* 2002, *1*, 183-187.
11. Teramachi F, Koyano T, Kowithayakorn T, Hayashi M, Komiyama K, Ishibashi M. Collagenase inhibitory quinic acid esters from *Ipomoea pes-caprae*. *J. Nat. Prod.* 2005, *68*, 794-796.