

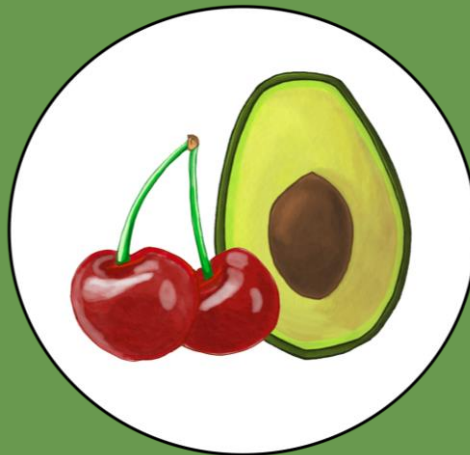


Universidad Miguel Hernández  
Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular



# **Cribado de extractos naturales a partir de subproductos de la industria frutícola para la obtención de nuevos principios activos con fines dermocosméticos**

**Luz María Agulló Chazarra**



Director de tesis

Dr. Enrique Barrajon Catalán

Co-directora de tesis

Dra. María Dolores Herranz López

Elche, 2021





## **UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche  
(IDIBE)

Cribado de extractos naturales a partir de subproductos de la  
industria frutícola para la obtención de nuevos principios activos  
con fines dermocosméticos

Tesis Doctoral

Luz María Agulló Chazarra

Elche, 2021





La presente tesis se presenta en la modalidad tradicional formada por el conjunto de trabajos previamente publicados:

➤ **31 UV Exposure and Skin Protective Effects of Plant.**

**Luz Agulló-Chazarra**; Almudena Pérez-Sánchez; María Herranz-López; Vicente Micol y Enrique Barraji3n-Catal3n.

Publicado en CAB International 2020. A Handbook of Environmental Toxicology: Human Disorders and Ecotoxicology. Editado por J. P. F. D'Mello. **Capítulo de libro**. ISBN: 978-1-78-639467-5. <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781786394675/>

➤ **Sweet Cherry Byproducts Processed by Green Extraction Techniques as a Source of Bioactive Compounds with Antiaging Properties.**

**Luz Agull3-Chazarra**; Isabel Borr3s-Linares; Jes3s Lozano-S3nchez; Antonio Segura-Carretero; Vicente Micol; Mar3a Herranz-L3pez y Enrique Barraji3n-Catal3n.

Antioxidants. 2020 May 13; 9, 418. **Impact Factor: 5.014** (2019). **Q1**. doi:10.3390/antiox9050418. PMID: 32414056 PMCID: PMC7278782.





El Dr. Enrique Barraji3n Catal3n, profesor Contratado Doctor de la Universidad Miguel Hern3ndez del Departamento de Ingenier3a, 3rea de Farmacia y Tecnolog3a Farmac3utica, y la Dra. Mar3a Dolores Herranz L3pez, profesora asociada e investigadora Junior de la Universidad Miguel Hern3ndez del Departamento de Bioqu3mica y Biolog3a Molecular,

### **CERTIFICAN**

Que el trabajo de investigaci3n que conduce a la obtenci3n del grado de Doctora: “**Cribado de extractos naturales a partir de subproductos de la industria frut3cola para la obtenci3n de nuevos principios activos con fines dermocosm3ticos**” que es autora D3a. Luz Mar3a Agull3 Chazarra, ha sido realizado bajo nuestra direcci3n en el Instituto de Investigaci3n, Desarrollo e Innovaci3n en Biotecnolog3a Sanitaria de Elche (IDIBE) y se desarrolla en modalidad tradicional.

Para que consten los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche (Alicante), abril 2021.

Dr. Enrique Barraji3n Catal3n

Dra. Mar3a Dolores Herranz L3pez







La Dra. Asia Fernández Carvajal, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y coordinadora del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIBE) de la Universidad Miguel Hernández (UMH) de Elche,

### **CERTIFICA**

Que la doctoranda Luz María Agulló Chazarra, ha completado el Programa de formación Doctoral en Biología Molecular y Celular, alcanzando los objetivos establecidos en el mismo. Y que la tesis titulada: “**Cribado de extractos naturales a partir de subproductos de la industria frutícola para la obtención de nuevos principios activos con fines dermatocósméticos**” reúne los indicios de calidad mínimos exigidos para el campo de evaluación. La estudiante es la primera firmante de los siguientes artículos:

➤ **31 UV Exposure and Skin Protective Effects of Plant.**

**Luz Agulló-Chazarra**; Almudena Pérez-Sánchez; María Herranz-López; Vicente Micol y Enrique Barrajaón-Catalán. Publicado en CAB International 2020. A Handbook of Environmental Toxicology: Human Disorders and Ecotoxicology. Editado por J. P. F. D'Mello. **Capítulo de libro**. ISBN: 978-1-78-639467-5. <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781786394675/>

➤ **Sweet Cherry Byproducts Processed by Green Extraction Techniques as a Source of Bioactive Compounds with Antiaging Properties.**

**Luz Agulló-Chazarra**; Isabel Borrás-Linares; Jesús Lozano-Sánchez; Antonio Segura-Carretero; Vicente Micol; María Herranz-López y Enrique Barraión-Catalán. *Antioxidants*. 2020 May 13; 9, 418. doi:10.3390/antiox9050418. PMID: 32414056 PMCID: PMC7278782.

La revista **Antioxidants** está indexada en el *Journal of Citation Report*. La revista pertenece al primer cuartil, **Q1**, de “Medicinal Chemistry”, “Food Science and Technology” y “Biochemistry and Molecular Biology” y posee un **Factor de Impacto de 5,014** (2019).

Por ello, DA SU CONFORMIDAD para la defensa por tesis tradicional y para que consten los efectos oportunos, firma el presente certificado.

En Elche (Alicante), abril de 2021.

Fdo.: Dra. Asia Fernández Carvajal



Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a un contrato predoctoral asociado al Proyecto de Investigación denominado: “El carácter multifactorial de los polifenoles: una oportunidad para el desarrollo de herramientas terapéuticas frente a la obesidad y las enfermedades infecciosas. PROMETEO/2016/006”, con número de referencia 104/17, incluido en el programa de subvención Prometeo para grupos de investigación de excelencia, concedido por la Conselleria de Educación, Cultura y Deporte de la Generalitat Valenciana. También fue concedida una ayuda para la movilidad bajo el programa de subvenciones para estancias de contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunitat Valenciana con referencia BEFPI/2019/044 de tres meses en l’Institut d’Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGi), cofinanciada por la Generalitat Valenciana y el Fondo Social Europeo.



*En medio de la tormenta,  
siempre habéis sido la calma.  
Ohana.*



## Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores, **Enrique Barraión** y **María Herranz**, por su trabajo durante la tesis. Especialmente, quisiera resaltar la labor de Kike, su ayuda frente a los problemas que nos fueron surgiendo y en la toma de decisiones. Además, quisiera agradecer a **Vicente Micol** por acogerme en el grupo de investigación, hace unos cuantos años.

Durante mi tesis doctoral he podido contar con la ayuda de muchas personas, a las cuales quisiera agradecer. Gracias, **Asia** y **Ricardo**, por toda vuestra ayuda y al personal de secretaría, especialmente a **Pepi** y **Javier**. Os implicasteis mucho más de lo necesario.

Durante estos años en el edificio Torregaitán he tenido la suerte de conocer a muchas personas, algunas de forma breve y otras en profundidad. Todos los estudiantes que fueron pasando por el laboratorio dejaron su huella, pero algunos marcaron especialmente. Al igual que ellos vinieron a aprender, nosotros también aprendimos de ellos y quisiera destacar a los que pude conocer mejor. **Adrián**, nos mostraste el entusiasmo, la ilusión y las ganas de aprender. **Jésica**, eres una de las personas más fuertes que conozco, creciéndote siempre ante la adversidad. Y **Víctor**, una persona divertida y alegre pero seria y responsable en su trabajo, nunca te rendiste ante los problemas que surgieron. Tu mera presencia en el laboratorio ya provocaba sonrisas y, sin duda, alegrabas el ambiente de trabajo. Tienes una chispa y una energía que espero que no pierdas nunca.

No podía faltar un enorme agradecimiento a todos los compañeros de trabajo con los que he compartido tantos años y experiencias. Ha sido un verdadero placer conocerlos, trabajar con vosotros y poder consideraros mis amigos. Además, quisiera ensalzar la gran labor de los técnicos de laboratorio, que cumplen un papel esencial en el desarrollo de la investigación. **Maite**, me has ayudado con tantas cosas, con los ensayos, con la preparación de reactivos e incluso buscabas ayuda externa si era necesario para resolver las dudas. Has sido una persona fundamental en el transcurrir de esta tesis. **María Losada**, en ti encontré a la persona más afín a mis gustos y aficiones y al menos tú disfrutabas de los “debates/discusiones” a la hora de comer y de los chistes malos. **Mariló**, contigo pude compartir además todos los años del grado, eres el claro ejemplo de una excelente trabajadora y compañera. **Noelia**, desde el primer momento destacaste por tu gran capacidad de trabajo y espero que te vaya todo bien en lo que te queda de tesis. **Sara**, eres como la prima cuya visita siempre esperas, en el recuerdo quedan muchas experiencias, como el momento éter y el pasillo arácnido.

He tenido la gran fortuna de conocer a muchas personas a lo largo de estos años, he compartido todo este tiempo con buenos compañeros y mejores personas, solo algunos de los cuales he mencionado. Dentro de todas ellas, debo destacar haberos conocido, Almu y Vero. He aprendido con vosotras y de vosotras, hemos pasado grandísimos e inolvidables

momentos durante todos estos años. Quién diría que personas tan diferentes como **AlmuOhYeah** y yo íbamos a ser tan compatibles, a pesar de que no compartimos la opinión en muchas cosas siempre prima el respeto y “Sierra Nevada”. Además, siento un nexo de cariño con tus padres, aunque en persona solo los haya visto un par de veces. Y **Vero**, en ti encontré la sorpresa de compartir lugares pasados y hábitos camperos. Eres una de las mejores personas que conozco y, como ya te he dicho en algunas ocasiones, parece ser un don de familia. Sin embargo, mi agradecimiento no se debe únicamente a vuestro apoyo, sino que habéis participado activamente en esta tesis y, por ello, también merecéis mi agradecimiento. Mención especial a la Tablet de Vero, sin ti las frutas no habrían sido lo mismo.

Durante la tesis, he tenido la oportunidad de irme de estancia a otro grupo de investigación, donde he podido conocer de primera mano cómo trabajan en otros laboratorios. En los tres meses que estuve en el grupo del **Dr. Fernández-Real**, en el IdIBGi de Girona, pude enriquecer en gran medida mi formación, aprendiendo diversos métodos de genética y sobre los diferentes proyectos del grupo. Gracias a **Paco**, quien fue el encargado de todo lo que aprendí, por su apoyo y por la integración que viví con todos los del grupo y muchas otras personas del edificio. Gracias a todos vosotros, **Ana, Jess, Ferrán, Jose, Nuria** y todos los demás.

El trabajo que se refleja en esta tesis también implica una parte muy importante fuera de la universidad, por lo que quiero agradecer a las personas que me acompañaron durante todo este tiempo. Quisiera destacar a cuatro personas, ya que han sido pilares fundamentales en mi vida y, al final, sin el apoyo suficiente hasta la torre más grande se derrumba. Dani y Yaiza, sois los que lleváis más tiempo en mi vida, siendo los mejores amigos que pudiera desear. **Dani**, contigo me he reído como nunca, he disfrutado durante incontables horas y me has ayudado siempre que lo he necesitado. No hay forma de agradecerte todo lo que has hecho por mí y mi familia. Hacen falta más personas como tú en este mundo. **Yaiza**, eres la persona que todo el mundo debería tener en su vida, alguien que te diga en cada momento lo necesario para poder seguir avanzando. Personas como tú hay pocas y yo tengo la gran suerte de poder contar contigo. **Antonio**, demuestras cada día lo que te preocupas por mí y que siempre estás dispuesto a ayudarme. Gracias por tantísimo apoyo, tanta ayuda y tanta paciencia. No podría pedir nada más. Gracias también a **Puri** y **Antonio**, que me hacen sentir como en mi propia casa. **Melania**, sin ti, mi vida habría sido muy distinta y definitivamente peor. Hablo de apoyos, pero tú has sido mi pilar durante toda mi vida. He tenido la grandísima suerte de compartir contigo aficiones, gustos y hasta temática de estudio. Eres la persona más importante de mi vida y la mayor constante.

Además, quería mencionar a los amigos que han estado ahí durante todos estos años. **Jose, Edu, Saray, Jose Payá, Raquel** e **Imanol**, con vosotros los fines de semana tienen otro color.



Por último, quisiera agradecer a toda mi familia por estar ahí. Siempre e incondicionalmente. Con vosotros aprendí los valores de la vida, lo que de verdad importa y el valor de la familia. Sois mi bien máspreciado. Quisiera agradeceros a todos lo que habéis hecho por mí. A **mis padres**, sois mi ejemplo a seguir. Me habéis enseñado la importancia de la confianza y el compañerismo, a avanzar pero nunca pisando a los demás. A mis hermanos, **Cristian y Melania**, porque con vosotros la vida nunca puede ser aburrida. A mi cuñada, **Miriam**, por haber estado ahí en los momentos más difíciles.

A mi familia paterna, mis tíos **Juanita, Antonio y Carlos**, porque sois el ejemplo de que hay que seguir siempre hacia delante. A mis primos **Maria Ángeles, Daniel, Vicente, Alberto y Juan Antonio**, el primer doctor de la familia. A pesar de la diferencia de edad, siempre nos divertíamos en las comidas familiares.

También quisiera agradecer a mi familia materna, que siempre me han enseñado la importancia de la familia. A mis tíos **Pepe, José, Carmen y Tere**, sois como mis segundos padres. Representáis lo mejor de ser familia. **Abuela**, es increíble cómo sigues cuidando de tus bisnietos, igual que cuidaste de los nietos. A mis primos **Saray, Maite y Francisco**, habéis sido como hermanos. Lo mejor de la infancia fueron los veranos en la huerta, básicamente crecimos juntos ahí. **Adam y Sofía**, si en un futuro se os despierta el gusanillo de la ciencia ya sabéis que podéis preguntar a vuestras tías. Espero que el futuro os depare la mejor cara.

Y, para terminar, quisiera agradecer a todos los que estuvieron, pero ya no pueden estar.

A todos vosotros, gracias.



# Índice

Abreviaturas y acrónimos.....	1
Índice de Figuras .....	5
Índice de Tablas .....	9
Resumen .....	11
Abstract .....	13
INTRODUCCIÓN .....	15
1. La industria cosmética.....	17
1.1. Características de la industria cosmética.....	17
1.2. La cosmética en Europa .....	19
1.3. Sector cosmético en España .....	21
1.4. Regulación productos cosméticos .....	22
1.5. Cosmecéuticos y principios activos .....	25
2. La piel y la matriz extracelular.....	27
2.1. El envejecimiento de la piel y sus causas.....	33
2.2. Protectores solares.....	43
3. Extractos naturales y metabolitos secundarios de plantas.....	45
3.1 Aprovechamiento de residuos de la industria frutícola como subproductos... ..	54
3.2 Extractos de rabo de cereza como fuentes de compuestos bioactivos.....	55
3.3 Extractos de aguacate como fuentes de compuestos bioactivos.....	57
HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS .....	59
METODOLOGÍA .....	63
1. Materia prima para la obtención de extractos naturales .....	65

2.	Procesos de extracción .....	66
2.1	Extracción con solvente a presión (PLE) .....	66
2.2	Extracción con fluido supercrítico (SFE).....	67
2.3	Extracción con agua subcrítica (SWE).....	68
3.	Análisis de los extractos por HPLC-ESI-QTOF-MS .....	68
4.	Estudio de la bioactividad de los extractos.....	71
4.1	Condiciones de preparación de los extractos.....	71
4.2	Determinación del contenido fenólico mediante el ensayo Folin-Ciocalteu.....	72
4.3	Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos mediante diversos ensayos antioxidantes.....	73
4.4	Inhibición de enzimas relacionadas con el envejecimiento.....	77
4.5	Determinación de la inducción de melanogénesis y fotoprotección de los extractos en modelos celulares .....	79
5.	Análisis estadístico .....	84
CAPÍTULO 1 – Caracterización y determinación de la actividad de tres extractos de rabo de cereza.....		85
RESULTADOS .....		87
1.	Caracterización de la composición de los extractos de rabo de cereza .....	89
2.	Determinación de la actividad biológica de los extractos de rabo de cereza....	98
2.1	Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de los extractos de rabo de cereza.....	99
2.2	Inhibición de algunos procesos enzimáticos relacionados con el envejecimiento de la piel por el extracto scSFE.....	102
2.3	Efecto protector del extracto scSFE frente a la radiación UVB .....	104

2.4	Inhibición de la producción de ROS intracelular por el extracto scSFE inducida por la radiación UVA y UVB .....	106
	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	109
1.	La actividad antioxidante del extracto scSFE se podría deber a los polifenoles naringenina, catequina y crisina .....	111
2.	La actividad de inhibición de las enzimas cosméticas podría deberse a las catequinas del extracto scSFE .....	113
3.	El efecto fotoprotector del extracto scSFE podría deberse principalmente a la absorción de la radiación UV y también a su actividad antioxidante.....	115
	CAPÍTULO 2 – Cuantificación y análisis de la composición y bioactividad de tres extractos de piel y tres extractos de semilla de aguacate .....	117
	RESULTADOS .....	119
1.	Caracterización de los extractos de piel y semilla de aguacate .....	121
2.	Determinación de la actividad biológica de los extractos de piel y semilla de aguacate.....	134
2.1	Contenido fenólico y capacidad antioxidante de los extractos de aguacate mediante los ensayos Folin y TEAC .....	135
2.2	Capacidad antioxidante en los ensayos FRAP y ORAC de los extractos de piel de aguacate .....	136
2.3	Inducción de la melanogénesis en la línea celular B16-F10 de los extractos P65 y P85 .....	138
2.4	Determinación de la capacidad antioxidante del extracto P85 frente a la peroxidación lipídica y los radicales libres hidroxilo y óxido nítrico .....	139
2.5	Fotoprotección del extracto de piel de aguacate P85 contra la radiación UVB.....	141
2.6	Inhibición de la producción de ROS intracelular inducida por la radiación UVA y UVB mediante el tratamiento con el extracto P85 .....	143

DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	147
1. La actividad antioxidante de los extractos de aguacate se debe a los compuestos fenólicos .....	149
2. La actividad antioxidante del extracto P85 se podría deber principalmente a la catequina, ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico y procianidinas .....	153
3. El extracto P85 muestra una inducción de la síntesis de melanina .....	156
4. El efecto fotoprotector del extracto P85 se podría deber principalmente a un efecto pantalla y a su capacidad antioxidante.....	157
CONCLUSIONES .....	161
BIBLIOGRAFÍA.....	167
ANEXO: Artículos científicos de la Tesis Doctoral .....	181

## Abreviaturas y acrónimos

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>β-PE</b>	β-ficoeritrina (del inglés, <i>β-Phycoerythrin</i> )
<b>AAPH</b>	2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>AGEs</b>	Productos de glicación avanzada (del inglés, <i>Advanced Glycation End products</i> )
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza (del inglés, <i>Analysis of variance</i> )
<b>ATCC</b>	Colección americana de cultivos tipo (del inglés, <i>American Type Culture Collection</i> )
<b>BHT</b>	Butil hidroxitolueno
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CIDAF</b>	Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional
<b>CPNP</b>	Portal de notificación de productos cosméticos (del inglés, <i>Cosmetic Products Notification Portal</i> )
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (del inglés, <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> )
<b>ECVAM</b>	Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (del inglés, <i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> )
<b>EgCg</b>	Epigallocatequina galato
<b>Eq.</b>	Equivalente

<b>ESI</b>	Ionización por electrospray (del inglés, <i>Electrospray ionization</i> )
<b>FALGPA</b>	<i>N</i> -[3-(2-furil) aciloil]-Leu-Gly-Pro-Ala
<b>FPS</b>	Factor de Protección Solar
<b>FRAP</b>	Poder antioxidante reductor del hierro (del inglés, <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
<b>GAE</b>	Equivalentes de Ácido Gálico (del inglés, <i>Gallic Acid Equivalent</i> )
<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>IBMX</b>	3-isobutil-1-metilxantina
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibición del 50% (del inglés, <i>Inhibitory Concentration</i> )
<b>MEP</b>	Metileritritol fosfato (del inglés, <i>Methylerythritol phosphate</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de masas (del inglés, <i>Mass spectrometry</i> )
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
<b>ND</b>	No Detectado
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>ORAC</b>	Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (del inglés, <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> )
<b>P45</b>	Extracto de piel de aguacate obtenido a 45 °C
<b>P65</b>	Extracto de piel de aguacate obtenido a 65 °C
<b>P85</b>	Extracto de piel de aguacate obtenido a 85 °C
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PLE</b>	Extracción con solvente a presión (del inglés, <i>Pressurized Liquid Extraction</i> )



<b>PMSF</b>	Fenilmetanosulfonilo (del inglés, <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>Proc.</b>	Procianidina
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>Q-TOF</b>	Cuadrupolo-Tiempo de vuelo (del inglés, <i>Quadrupole Time-of-Flight</i> )
<b>RNS</b>	Radicales libres del nitrógeno (del inglés, <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
<b>ROS</b>	Radicales libres del oxígeno (del inglés, <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S45</b>	Extracto de semilla de aguacate obtenido a 45 °C
<b>S65</b>	Extracto de semilla de aguacate obtenido a 65 °C
<b>S85</b>	Extracto de semilla de aguacate obtenido a 85 °C
<b>SANA</b>	N-Succ-(Ala) 3-nitroanilida
<b>scPLE</b>	Extracto de rabo de cereza mediante extracción con solvente a presión
<b>scSFE</b>	Extracto de rabo de cereza mediante extracción por fluidos supercríticos
<b>scSWE</b>	Extracto de rabo de cereza mediante extracción por agua subcrítica
<b>SD</b>	Desviación estándar (del inglés, <i>Standard Deviation</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio (del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SFE</b>	Extracción con fluido supercrítico (del inglés, <i>Supercritical Fluid Extraction</i> )
<b>SWE</b>	Extracción con agua subcrítica (del inglés, <i>Subcritical Water Extraction</i> )
<b>SUVs</b>	Vesículas pequeñas unilamelares (del inglés, <i>Small Unilamellar Vesicles</i> )
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico (del inglés, <i>Thiobarbituric acid</i> )

<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (del inglés, <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> )
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente al trolox (del inglés, <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> )
<b>TPTZ</b>	Tripiridiltriazina
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UHD</b>	Ultra alta precisión (del inglés, <i>Ultra High Definition</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Datos de venta (en miles de millones de €) de los diferentes mercados mundiales en el año 2019.....	20
<b>Figura 2.</b> Valores económicos de ventas de productos cosméticos de los 5 principales países de la UE en el año 2019.....	20
<b>Figura 3.</b> Porcentajes de venta de los distintos tipos de productos cosméticos sobre el total de ventas en España en el año 2019 .....	22
<b>Figura 4.</b> Principales características de los cosmeceúticos. ....	26
<b>Figura 5.</b> Representación de las distintas capas de la piel.....	28
<b>Figura 6.</b> Transferencia de melanina de los melanocitos a los queratinocitos mediante los melanosomas. ....	29
<b>Figura 7.</b> Radiación ultravioleta A, B y C y la relación inversamente proporcional de capacidad de penetración y energía.....	35
<b>Figura 8.</b> Principales efectos de la radiación ultravioleta .....	37
<b>Figura 9.</b> Equilibrio entre radicales libres y sistema antioxidante .....	39
<b>Figura 10.</b> Algunos de los factores internos y externos que inducen a la formación de radicales libres en el organismo. ....	39
<b>Figura 11.</b> Producción de las distintas especies reactivas del oxígeno a partir de la molécula de oxígeno .....	40
<b>Figura 12.</b> Producción del peroxinitrito. ....	41
<b>Figura 13.</b> Comparación de filtros físicos y orgánicos.....	44

<b>Figura 14.</b> Objetivos de desarrollo sostenible promovidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU). .....	46
<b>Figura 15.</b> Vías del metabolismo primario y secundario del carbono implicadas en la producción de polifenoles y terpenos. ....	48
<b>Figura 16.</b> Principales grupos de los polifenoles.....	49
<b>Figura 17.</b> Rama de cerezo con hojas y flores y fruto del cerezo.....	56
<b>Figura 18.</b> Representación de una rama de aguacate con hojas, fruto y sus flores ....	57
<b>Figura 19.</b> Lector de placas SPECTROstar Omega. ....	72
<b>Figura 20.</b> Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT y línea celular murina de melanoma B16-F10 .....	80
<b>Figura 21.</b> Equipo Bio-Link Crosslinker BLX-365.....	82
<b>Figura 22.</b> Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode. ....	82
<b>Figura 23.</b> Cromatograma de pico base de los extractos de rabo de cereza obtenidos por los métodos de extracción SFE, PLE y SWE .....	89
<b>Figura 24.</b> Algunos de los compuestos mayoritarios semicuantitativamente determinados en los 3 extractos de rabo de cereza scSFE, scPLE y scSWE .....	96
<b>Figura 25.</b> Datos semicuantitativos sobre las diferentes familias de compuestos extraídos mediante las técnicas SFE, PLE y SWE .....	97
<b>Figura 26.</b> Efecto en la viabilidad celular del extracto scSFE después de irradiar con UVB .....	105

<b>Figura 27.</b> Determinación de la actividad antioxidante del extracto scSFE relacionada con el aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno debido al UVA y UVB en la línea celular HaCaT.....	107
<b>Figura 28.</b> Cromatogramas representativos de los extractos de semilla y de piel de aguacate.....	121
<b>Figura 29.</b> Compuestos más representativos de los extractos de piel y de semilla de aguacate.....	131
<b>Figura 30.</b> Diagramas de porcentajes de contenido de cada familia de compuestos para los extractos de piel y semilla de aguacate obtenidos a 45, 65 y 85 °C.....	132
<b>Figura 31.</b> Determinación de la inducción de melanogénesis producida por los extractos P65 y P85 en la línea celular B16-F10 tras 72 horas de tratamiento.....	138
<b>Figura 32.</b> Efecto en la viabilidad celular del extracto P85 24 horas después de irradiar con UVB.....	141
<b>Figura 33.</b> Determinación de la actividad antioxidante del extracto P85 frente al estrés oxidativo inducido por la radiación UVA y UVB en la línea celular HaCaT. ....	143



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los terpenos en función del número de átomos de carbono y de isopreno. ....	52
<b>Tabla 2.</b> Datos analíticos de los extractos de rabo de cereza obtenidos mediante análisis por HPLC-ESI-QTOF-MS. ....	90
<b>Tabla 3.</b> Áreas relativas de los picos de los compuestos identificados en los extractos de rabo de cereza.....	93
<b>Tabla 4.</b> Contenido fenólico de los extractos determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y capacidad antioxidante determinado mediante el ensayo TEAC, para los extractos scSFE, scPLE y scSWE.....	99
<b>Tabla 5.</b> Capacidad antioxidante de los extractos scSFE y scPLE mediante dos métodos diferentes: FRAP determina la actividad comparado con el sulfato de hierro y ORAC respecto al trolox.....	100
<b>Tabla 6.</b> Capacidad antioxidante del extracto scSFE. Los resultados muestran la actividad contra la peroxidación lipídica mediante el ensayo TBARS, eliminación del radical hidroxilo determinada mediante el ensayo ORAC <sub>OH</sub> y la capacidad del extracto (200 µg/mL) de eliminar el radical óxido nítrico.....	102
<b>Tabla 7.</b> Determinación del porcentaje de inhibición de la colagenasa, tirosinasa, elastasa, hialuronidasa y glicación por el extracto scSFE.....	103
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de fotoprotección para 100 o 200 µg/mL del extracto scSFE tras la irradiación con 800 o 1200 J/m <sup>2</sup> de UVB.....	105
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de inhibición del estrés oxidativo (%) producido por el extracto scSFE contra la producción de radicales libres inducida por la radiación UVA y UVB.....	107

<b>Tabla 10.</b> Parámetros e identificación de los compuestos obtenidos en los extractos de aguacate.....	122
<b>Tabla 11.</b> Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de piel y semilla de aguacate en función de la temperatura de secado .....	126
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de ácido gálico equivalente determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y capacidad antioxidante determinada mediante el ensayo TEAC para los extractos de piel de aguacate, P45, P65 y P85, y para los de semilla de aguacate, S45, S65 y S85 .....	135
<b>Tabla 13.</b> Capacidad antioxidante de los extractos P45, P65 y P85 mediante los ensayos FRAP y ORAC.....	137
<b>Tabla 14.</b> Capacidad antioxidante del extracto P85 determinada mediante el ensayo TBARS, una modificación del ensayo ORAC y la eliminación del óxido nítrico ....	140
<b>Tabla 15.</b> Porcentaje de fotoprotección del extracto P85 tras la irradiación con UVB.....	142
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de inhibición del estrés oxidativo del extracto P85 inducido por la radiación UVA y UVB .....	144



## Resumen

La industria cosmética se caracteriza por una alta competencia y necesidad de renovación. Dentro de los distintos productos de esta industria, los cosmeceúticos son aquellos que tienen principios activos con actividades beneficiosas que se relacionan con la industria farmacéutica. Los compuestos bioactivos naturales han mostrado diversas actividades relacionadas con la cosmética, entre ellas la actividad antioxidante y la capacidad de protección frente a la radiación solar.

El principal objetivo de este trabajo ha sido la búsqueda de principios activos para la obtención de nuevos ingredientes cosméticos a partir de la caracterización, estudio y cribado de diferentes extractos naturales, obtenidos a partir de subproductos de la industria frutícola, en concreto de la industria de la cereza y el aguacate.

El extracto scSFE fue elegido entre 3 diferentes extractos de rabo de cereza obtenidos mediante 3 métodos distintos de extracción: solvente a presión, fluido supercrítico y agua subcrítica. Por otro lado, el extracto de piel de aguacate P85 fue escogido entre 6 extractos de semilla y piel de aguacate obtenidos a 3 temperaturas de secado distintas. Ambos extractos han demostrado una alta capacidad antioxidante en diferentes ensayos *in vitro*, así como la capacidad de proteger frente a la radiación ultravioleta A y B en un modelo celular de piel. Adicionalmente, el extracto scSFE ha mostrado la capacidad de inhibir enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular, lo cual se relaciona con una actividad de antienvjecimiento, y el extracto P85 ha mostrado un efecto melanogénico en un modelo celular de melanoma murino. Esta actividad podría deberse a los compuestos mayoritarios de ambos extractos, especialmente los polifenoles, que son compuestos bioactivos producidos por el metabolismo secundario de las plantas y han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional, así como en la industria farmacéutica y cosmética.

Estas actividades que han presentado ambos extractos los postula como potenciales candidatos para ser utilizados en productos dermocosméticos, especialmente enfocados a la protección solar y productos antienvjecimiento. No obstante, son necesarios futuros estudios para determinar con total detalle el mecanismo de acción mediante el cual ejercen su efecto.



## Abstract

In cosmetic industry, there is a fierce competition, having been claimed the need for renewal. Cosmetic products include cosmeceuticals, which are those that include principles with beneficial activities related to pharmaceutical industry. Natural bioactive compounds have shown various activities related to cosmetics, including antioxidant activity and the ability to protect against solar radiation.

The aim of this project has been the search of active principles to obtain new dermocosmetic products. For this purpose, we have studied, characterized and selected extracts obtained from natural sources. These products were obtained from byproducts of sweet cherry and avocado industry.

The scSFE extract was chosen from 3 different cherry stem extracts obtained by 3 extraction methods: pressurized solvent extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction. Furthermore, the P85 avocado peel extract was chosen from 6 avocado seed and peel extracts dried at three different temperatures. Both extracts, scSFE and P85, have shown a high antioxidant capacity in different *in vitro* tests, as well as the ability to protect against ultraviolet A and B radiation in a cell model. Additionally, the scSFE extract has shown the ability to inhibit enzymes that degrade components of the extracellular matrix, which is related to an anti-aging activity. Furthermore, the P85 extract has shown a melanogenic effect in a murine melanoma cell model. This activity could be due to the main compounds of both extracts, especially polyphenols. Polyphenols are bioactive compounds produced by the secondary metabolism of plants and have been widely used in traditional medicine and pharmaceutical and cosmetic industries.

These activities presented by both extracts show them as potential candidates to be used in dermo-cosmetic products, particularly focused on sun protection and anti-aging products. However, future studies are necessary to determine completely the mechanism of action for these activities.



# **INTRODUCCIÓN**



## **1. La industria cosmética**

La cosmética es la parte de la industria encargada de la investigación, desarrollo, fabricación y venta de los productos que tienen como objetivo el mantenimiento o mejora del aspecto físico de los individuos sin que se alteren las funciones normales de la piel. Entre estos productos se incluyen los encargados de la belleza de la piel y del cabello, el maquillaje, perfumes y productos de cuidado personal. Los productos cosméticos se pueden agrupar según la función que desempeñen o la zona de aplicación.

La industria cosmética engloba diferentes ramas de conocimientos que son necesarias para el desarrollo, estudio y fabricación de los productos cosméticos. En esta industria participan diferentes ramas de la ciencia y la ingeniería como la química, la biología, la ingeniería de procesos, la ingeniería mecánica, la farmacología y la medicina.

### **1.1. Características de la industria cosmética**

La industria cosmética se caracteriza por presentar una competitividad muy elevada, lo que conlleva la necesidad de renovación e innovación constante. Además, posee una regulación muy estricta, que garantiza la seguridad del producto antes de poder ser vendido. La necesidad de renovación e innovación deriva de la alta variedad de productos y del corto ciclo de vida que tienen, que suele ser de unos cinco años aproximadamente. Dentro de una empresa, se puede renovar la línea de productos disponibles mediante la introducción de productos o ingredientes cosméticos nuevos o

bien reformulaciones que aporten un valor añadido a un producto ya existente, pudiendo alargar de esta forma su ciclo de vida [1].

En el caso del desarrollo de nuevas reivindicaciones, es necesaria la realización de los estudios pertinentes para que los datos obtenidos sustenten las nuevas alegaciones del producto que se quieran realizar. Todos estos métodos de innovación permiten a las empresas diferenciarse de la competencia y aportar un valor añadido a sus productos, lo cual repercute en una mejora de las ventas y, por lo tanto, de su economía.

La necesidad de innovar de la industria cosmética aumenta la demanda de investigación que establece la seguridad y la eficacia de los productos cosméticos. Esta investigación implica una inversión en I+D+i de las grandes empresas que se estima que se da entre un 3 y un 5% de los beneficios de las ventas [2]. Además, la renovación constante y la necesidad de nuevos y mejores ensayos han provocado que la industria cosmética se haya visto incentivada a desarrollar nuevos análisis para la evaluación de sus productos. Por ello, se han desarrollado nuevas técnicas utilizando herramientas que sustituyan a la experimentación animal, debido a que la normativa actual en Europa prohíbe el uso de animales para el estudio y desarrollo de productos e ingredientes cosméticos. Esta normativa está descrita en la Directiva 2003/15/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de febrero, que modifica la Directiva 76/768/CEE del Consejo. Por este motivo, el desarrollo de estos ensayos alternativos a la experimentación animal es un valor añadido para la empresa cosmética que se puede trasladar desde este sector a otros sectores de investigación. Estos estudios pueden ser



*in silico*, *in vitro*, *ex vivo* o estudios con voluntarios sanos e incluyen el desarrollo de ensayos que determinan la calidad, eficacia y seguridad de los productos cosméticos.

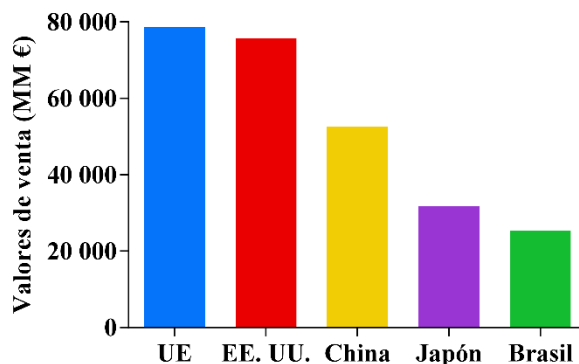
Además, la industria cosmética tiene un público objetivo que, cada vez más, solicita productos más ecológicos, tanto en su composición como en su fabricación, presentando una mejor percepción de los productos naturales respecto a los sintéticos por parte de los consumidores. Debido a esto, en los últimos años se ha visto una tendencia a desarrollar productos e ingredientes con marca ecológica u orgánica como reclamos de ventas y en la actualidad son numerosos los productos con principios activos naturales y/o ecológicos a la venta [3].

Todos estos factores, como ya se ha comentado, son causa y consecuencia de la alta innovación y competencia que caracteriza a la industria cosmética. Esto conlleva el desarrollo y evolución de los ensayos para encontrar nuevos productos o principios activos, así como para estudiar sus características, funciones y seguridad. Este desarrollo se produce paralelamente a la evolución de los productos, tanto en su fabricación como en el formato, y la evolución del mercado, que promueve el desarrollo de productos más eficaces y tiende a la búsqueda de los productos que los consumidores desean.

## **1.2. La cosmética en Europa**

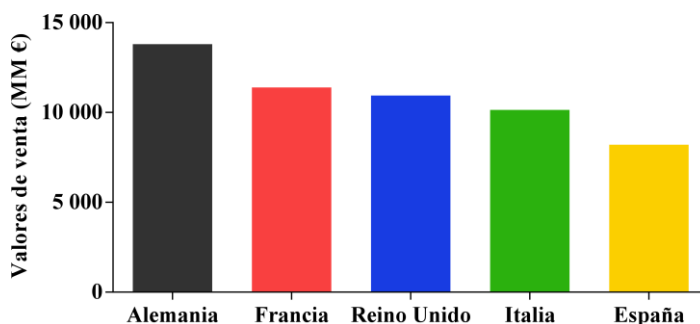
El mercado cosmético ocupa el 5º lugar en la categoría industrial a nivel global, mientras que el mercado cosmético europeo ocupa el 1º puesto a nivel mundial, seguido de Estados Unidos, China, Japón y Brasil (**Figura 1**). Este mercado de perfumería y

cosmética de la Unión Europea (UE) está valorado en el año 2019 con más de 500 millones de consumidores.



**Figura 1.** Datos de venta (en miles de millones de €) de los diferentes mercados mundiales en el año 2019. Datos obtenidos de Stanpa [4].

Dentro del mercado europeo, los países que presentan el mayor porcentaje de venta son, en orden decreciente, Alemania, Francia, Reino Unido, Italia y España (**Figura 2**).



**Figura 2.** Valores económicos de ventas de productos cosméticos de los 5 principales países de la UE en el año 2019. Datos obtenidos de Stanpa [4].

En cuanto a los productos más vendidos, los de cuidado de la piel y de higiene representan el mayor volumen de ventas, seguidos de los productos de cuidado del cabello y perfumes. Además, se estima que la industria cosmética aporta a nivel europeo

casi 2 millones de puestos de trabajo, incluyendo trabajos directos, indirectos o asociados [5, 6].

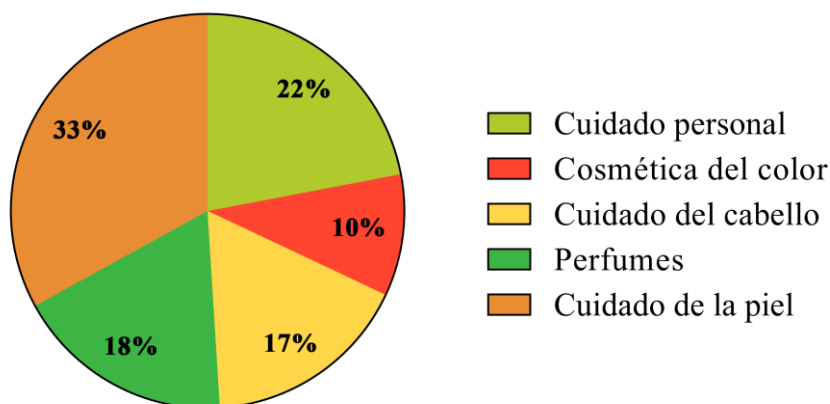
### **1.3. Sector cosmético en España**

En España, la autoridad competente en cuanto a productos cosméticos es la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), que se encarga de la vigilancia de los productos cosméticos [7].

Además, hay una asociación nacional, Stanpa, que incluye a numerosas entidades que se encargan de la fabricación y distribución de los productos cosméticos en España. Esta asociación recoge los datos pertenecientes a la industria cosmética española, entre los que se incluyen los datos económicos de este sector, que representaron un valor de 8.200 mil millones de euros en el año 2019 (**Figura 2**).

Actualmente, el sector cosmético en España se encuentra en una fase de crecimiento. En el año 2019 mostró un crecimiento de más del 2% por quinto año consecutivo y fue el 2º exportador mundial de perfumes, estando entre los 10 mejores de la clasificación de exportadores mundiales de productos de belleza. Estas exportaciones tuvieron un valor de 4.723 mil millones de euros en ese año, lo cual muestra la relevancia internacional de los productos cosméticos españoles. Por otro lado, en España se compraron un total de 1.540 millones de unidades, presentando un consumo *per cápita* de 170 €/año, superior a la media de Europa (140 €/año). La venta de productos del cuidado de la piel supuso el mayor volumen de ventas, con un 33%,

seguido de productos de cuidado personal, perfumes y del cuidado del cabello, que tuvieron un volumen de ventas correspondiente al 22, 18 y 17%, respectivamente. Por último, los productos de cosmética del color supusieron un 10% de las ventas en el año 2019 [4] (**Figura 3**).



**Figura 3.** Porcentajes de venta de los distintos tipos de productos cosméticos sobre el total de ventas en España en el año 2019. Datos obtenidos de Stanpa [4].

#### 1.4. Regulación productos cosméticos

La legislación de los productos cosméticos se encuentra incluida en el Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre. La regulación de estos productos tiene como principal objetivo asegurar su eficacia y calidad, así como la seguridad de los consumidores. Además, la normativa restringe tanto los métodos de desarrollo de los cosméticos como su venta y etiquetado.

Según este Reglamento, los productos cosméticos se definen como “toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo

humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales”. Este Reglamento Europeo regula la industria cosmética para todos los países miembros de la UE. En España, los aspectos que no están definidos en el Reglamento Europeo, como la cosmetovigilancia, se recogen en el Real Decreto 85/2018, de 23 de febrero.

Estas normativas especifican que los productos cosméticos deben cumplir una serie de requisitos para ser comercializados, entre los que se encuentran las condiciones que deben reunir las empresas que los elaboran y comercializan, además de las materias primas con los que son elaborados. *Cosmetics Europe* es la organización europea de cosmética, que establece la relación entre empresas y entidades regulatorias. Además, se encarga de estudiar las ventas de todos los productos cosméticos en Europa, así como los productos importados o exportados [8]. Además, hay una base de datos, CosIng, encargada de registrar la información de los productos cosméticos y sus ingredientes, así como la regulación y los requerimientos legales de los productos cosméticos [9].

La legislación a nivel europeo exige el registro de los productos cosméticos en el portal de notificación de productos cosméticos CPNP (del inglés, *Cosmetic Products Notification Portal*), que no se hayan hecho pruebas en animales y hace responsable de la vigilancia del mercado cosmético a nivel nacional a los países pertenecientes a la UE.

La legislación prohíbe las reivindicaciones de propiedades o funciones de los productos cosméticos que no se hayan corroborado con los estudios pertinentes, una

exageración de sus funciones, reivindicaciones falsas o que den lugar a una mala interpretación. Estos requisitos se recogen en el Reglamento (UE) N° 655/2013 de la Comisión, de 10 de julio, donde se establece que las reivindicaciones de los productos cosméticos deben cumplir con la legislación vigente; ser veraces; presentar datos que sustenten la reivindicación; cumplir el principio de honradez e imparcialidad y que la toma de decisiones sea realizada con conocimiento de causa [1]. Además, los estudios deben realizarse siempre siguiendo los estándares y prácticas de laboratorio establecidas. Para ello, las empresas deben cumplir con la Norma ISO 22716, que especifica la Guía de Buenas Prácticas de Fabricación para Productos Cosméticos. Esta normativa incluye factores humanos, técnicos o administrativos que pueden afectar al desarrollo de los productos. Además, tienen que seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio [10, 11]. Por último, como parte de los controles de calidad necesarios, se estudia la efectividad de los conservantes utilizados en los productos cosméticos, incluida en la Norma ISO 11930:2019, que trata la evaluación de la protección antimicrobiana de un producto cosmético.

A la luz de todos estos hechos, se ha puesto de manifiesto la importancia del desarrollo de la investigación en el área de la cosmética a través de nuevos métodos de evaluación sin animales, que mejoren la caracterización de los productos para el cuidado de la piel. Estos esfuerzos deben centrarse en impulsar la aceptación regulatoria de estas alternativas de nueva generación. En consecuencia y, a pesar de sus limitaciones, estos métodos alternativos a la experimentación animal deben ser capaces de aportar información comparable a los ensayos *in vivo* para poder reemplazarlos. A este respecto,

el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (del inglés, ECVAM) se encarga de validar modelos *in vitro* para garantizar la no toxicidad y seguridad de los ingredientes cosméticos. No obstante, actualmente no hay ensayos *in vitro* validados que reemplacen a los ensayos *in vivo* que evalúan la toxicidad aguda y crónica, carcinogenicidad y toxicología reproductiva. Además, otra limitación importante en el empleo de estos métodos es el uso de medio acuoso en los ensayos celulares, por lo que la disolución de algunos compuestos lipofílicos podría ser un inconveniente a la hora de valorar la seguridad de los cosméticos en estos ensayos [12].

### **1.5. Cosmecéuticos y principios activos**

Los cosmecéuticos son una subcategoría de productos cosméticos que se posicionan entre la cosmética y la farmacéutica (**Figura 4**). En esta categoría se incluyen los productos cosméticos que presentan principios activos con actividades que también son típicas de la industria farmacéutica. Se utiliza esta denominación para los productos tópicos que mejoren tanto la salud como el aspecto de la piel, pero cuya función no es curar ninguna enfermedad, sino que actúan sobre piel sana [13]. Por este motivo son incluidos dentro de la categoría de productos cosméticos, lo que permite a los cosmecéuticos acogerse a la regulación de los productos cosméticos, en lugar de incluirse en la regulación de productos farmacológicos.



**Figura 4.** Principales características de los cosmeceúticos.

Los cosmeceúticos pueden utilizar como principios activos diferentes compuestos, entre los que se encuentran los péptidos, productos vegetales, factores de crecimiento y vitaminas, entre otros compuestos [14]. El uso en los cosmeceúticos de estos principios activos puede presentar diferentes ventajas respecto a los productos cosméticos más tradicionales, como son la adición de nuevas actividades cosméticas y una mayor eficacia, lo cual otorga la posibilidad de nuevas y mejores reivindicaciones que en los productos cosméticos. Por este motivo, es importante estudiar el mecanismo de acción de estos ingredientes para conocer cómo ejercen su actividad y qué posibles efectos adversos podrían presentar. De esta forma, se puede asegurar su eficacia y seguridad [15]. Además, es conveniente estudiar si el principio activo llega a su diana y mantiene la concentración necesaria en el tiempo para poder ejercer su acción [16]. En este sentido, es de especial interés el uso de vehículos como liposomas que favorezcan la actividad del principio activo y su llegada a la diana. Por lo tanto, el desarrollo y estudio



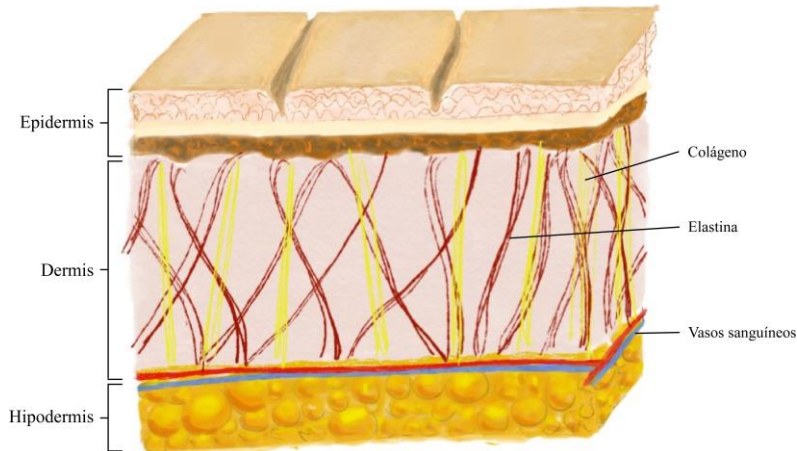
de las formulaciones son igualmente necesarios en el desarrollo de un nuevo producto cosmético [17].

## **2. La piel y la matriz extracelular**

La piel es el órgano con mayor extensión del cuerpo humano, presenta una superficie de alrededor de 2 metros cuadrados y un grosor entre 0,5 y 4 milímetros, siendo la primera barrera del organismo frente al exterior. Su principal función es la de actuar como una barrera impermeable y prevenir la pérdida excesiva de agua. La piel también presenta una función de protección frente a agresiones externas como las causadas por microorganismos, agentes químicos y mecánicos y por radiación solar [18-21]. Además, en la piel se localizan las terminaciones nerviosas y receptores relacionados con el sentido del tacto y la temperatura. Está compuesta por tres capas: **epidermis, dermis e hipodermis**. Cada una de ellas presenta diferentes poblaciones celulares, estructuras y funciones (**Figura 5**).

### **Epidermis**

La epidermis es la capa más externa de la piel. Está compuesta mayoritariamente por queratinocitos, pero también contiene melanocitos, receptores sensoriales y células de Langerhans y de Merkel. Además, la epidermis se divide en cuatro subcapas: el **estrato basal**, el **espinoso**, el **granuloso** y el **córneo** [20-23].

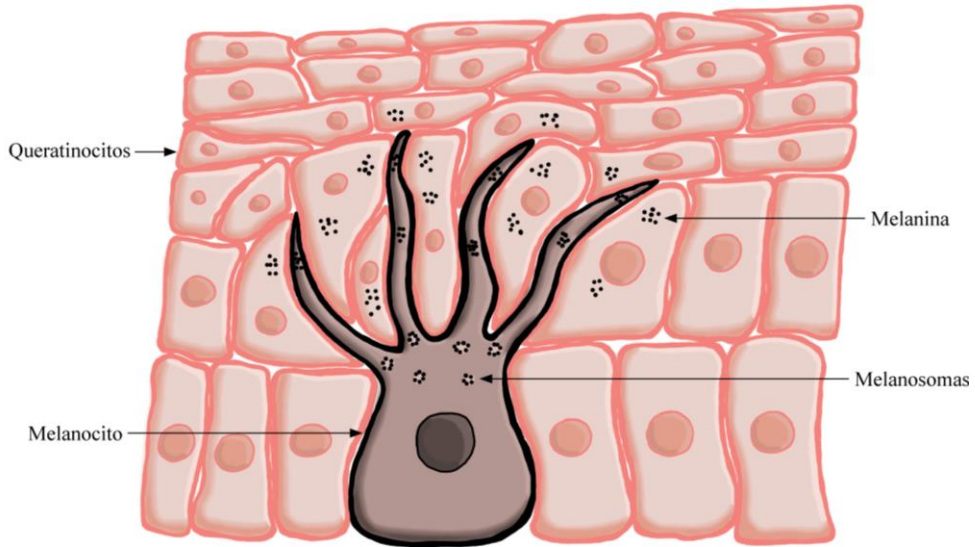


**Figura 5.** Representación de las distintas capas de la piel.

### Estrato basal

En el **estrato basal** se produce la renovación de la piel y la adhesión de la epidermis a la dermis. Esta subcapa contiene queratinocitos y melanocitos. Los queratinocitos son el tipo celular más común en la epidermis. La diferenciación de los queratinocitos se inicia en esta subcapa, antes de migrar al estrato espinoso. Por otra parte, los melanocitos situados en esa capa producen melanina, un pigmento que protege a la piel frente a la radiación ultravioleta (UV). A su vez, la melanina se divide en eumelanina y feomelanina. La eumelanina es un pigmento negro que protege de los fotones del UV con mayor eficiencia que la feomelanina, que presenta un color más claro que se produce al incorporarse cisteína a los precursores de melanina [24, 25]. Además de proteger frente al UV, la melanina tiene otras funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la regulación hormonal, el mantenimiento de la homeostasis epidérmica así como actividad antioxidante y antimicrobiana [26-32]. La melanina se produce en los

melanosomas, que son orgánulos con membrana encargados de la síntesis, almacenamiento, transporte y transferencia de la melanina de los melanocitos a los queratinocitos cercanos (**Figura 6**).



**Figura 6.** Transferencia de melanina de los melanocitos a los queratinocitos mediante los melanosomas.

### Estrato espinoso

En el **estrato espinoso**, los queratinocitos pierden la capacidad de proliferar y participan en el ensamblaje de la envoltura cornificada. Además de queratinocitos, en esta subcapa se encuentran las células de Langerhans, que son células dendríticas que actúan como presentadores de antígenos y participan en la respuesta inmune frente a microorganismos.

### Estrato granuloso

El **estrato granuloso** está formado por queratinocitos, que comienzan a morir por la vía apoptótica, perdiendo sus núcleos y orgánulos. En esta subcapa comienza la queratinización gracias a que estas células sintetizan queratina, una proteína que participa en la protección frente al calor, compuestos químicos y microorganismos, además de proteger frente a la deshidratación [33, 34].

### Estrato córneo

Por último, el **estrato córneo** es el más externo de la piel, se encuentra expuesto al exterior del organismo. Esta subcapa está compuesta por queratinocitos muertos, que protegen frente al daño mecánico, la deshidratación y dificultan la invasión de agentes externos como microorganismos. En esta capa se produce la descamación y la liberación de las células al exterior [34].

## **Dermis**

La dermis es la capa intermedia de la piel que se sitúa entre la hipodermis y la epidermis. Su principal función es mantener y dar apoyo a la epidermis. Está formada por dos capas de tejido conectivo: el *estrato papilar* y el *reticular*. El *estrato papilar* es una capa delgada rica en fibras de reticulina y capilares que aportan nutrientes a las capas más externas. El *estrato reticular* contiene numerosas fibras de colágeno y elastina, que conforman la **matriz extracelular** y otorgan soporte estructural y resistencia al estrés de la piel, tal y como se verá posteriormente. Además, esta capa contiene glándulas sudoríparas y folículos pilosos, así como terminaciones nerviosas,

capilares, células del sistema inmune y fibroblastos, que son los principales responsables de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular [35, 36].

### **Hipodermis**

Por último, la hipodermis, también llamada tejido subcutáneo, es la capa más profunda de la piel. Esta capa presenta un grosor variable que depende de la edad, de la zona del cuerpo y de la condición física y puede llegar a constituir un 15-30% del peso corporal. Está compuesta principalmente por tejido conectivo y adiposo, que participan en el aislamiento térmico, confieren protección mecánica y actúan como zona de almacenamiento de energía.

### **Matriz extracelular**

La **matriz extracelular** es el conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido. En el caso de la piel, hace referencia al espacio intercelular presente en la dermis. Sus funciones principales son actuar de soporte estructural, permitir la compresión y estiramiento de las células, la degradación de desechos y la regeneración de tejidos.

Los componentes de la matriz extracelular aportan un soporte funcional y estructural a la piel, siendo el colágeno la principal proteína de la matriz extracelular. Además, está compuesta por elastina, ácido hialurónico y proteoglicanos, entre otros.

El **colágeno** es la proteína más abundante del cuerpo humano. Engloba a una familia compuesta por 28 tipos diferentes de colágeno que se caracteriza por la

presencia de dominios de triple hélice. En la piel, las fibras de colágeno se forman con el tipo I y III y también se encuentra colágeno de tipo V, VI, VII y XI. La principal función del colágeno es unir las diferentes estructuras del organismo y aportar fuerza y elasticidad a la piel, participando además en el mantenimiento de la hidratación [37, 38].

La **elastina** es responsable de la elasticidad en el tejido conectivo de los órganos. Forma las fibras elásticas en la dermis junto con las microfibrillas, representando un 90% de las fibras elásticas. En el estrato reticular de la dermis, las fibras de elastina se entrelazan con las fibras de colágeno, contribuyendo a la elasticidad de la piel y al mantenimiento de sus propiedades mecánicas [38, 39].

El **ácido hialurónico** se localiza en el tejido conectivo, formando parte de la matriz extracelular. Está compuesto por una cadena lineal de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina alternados. Su principal función es la acumulación de agua, aportando resistencia a la deshidratación y manteniendo la correcta viscosidad e impermeabilidad de los tejidos conectivos [40].

La **glicación de proteínas** de la matriz extracelular se relaciona con el envejecimiento de la piel. La glicación es la modificación postraducciona no enzimática de los grupos amino de las proteínas por la acción de azúcares reductores, también llamada reacción de Maillard. Estas modificaciones originan la aparición de productos de glicación avanzada (del inglés, *Advanced Glycation End products* o AGEs). Los AGEs se relacionan con la modificación de la síntesis de moléculas de la matriz extracelular, citoquinas y la activación enzimática de las metaloproteinasas [41].

La degradación de los componentes de la matriz extracelular se produce de forma continua, participando en la renovación de los componentes de la piel. Esta degradación se produce por las metaloproteinasas, entre las que se incluyen la colagenasa, elastasa e hialuronidasa y puede verse alterada por diversos factores, como la curación de heridas u otros procesos patológicos [42]. El aumento de la degradación de los componentes de la matriz extracelular se relaciona con la aparición de arrugas y el envejecimiento de la piel. La radiación UV o el estrés oxidativo son factores que inducen la glicación de las proteínas y la degradación del colágeno, elastina y ácido hialurónico [43]. La inhibición de estas enzimas, así como de la glicación de las proteínas, se relaciona con el mantenimiento de la resistencia y elasticidad de la piel, la disminución en la aparición de arrugas y el envejecimiento de la piel y la mejora de su aspecto.

### **2.1. El envejecimiento de la piel y sus causas**

La piel puede sufrir dos procesos de envejecimiento diferentes: el envejecimiento intrínseco y el extrínseco. Se considera que el **envejecimiento intrínseco** es el envejecimiento fisiológico inevitable, que deriva en una piel fina y seca, arrugas y flacidez cutánea. Por otra parte, el **envejecimiento extrínseco** es aquel generado por factores ambientales externos como son la polución, el tabaco, malnutrición y la radiación ultravioleta. El envejecimiento extrínseco puede causar un envejecimiento prematuro de la piel y presenta como características la generación de arrugas de mayor tamaño, una apariencia rugosa, una mayor laxitud y la pérdida de elasticidad de la piel [15, 44].

La exposición solar es el factor más importante del envejecimiento extrínseco, y el envejecimiento asociado a ella se denomina de manera más específica como fotoenvejecimiento. Se caracteriza por la aparición de arrugas y marcas en la piel, sequedad, pérdida de elasticidad e hiperqueratosis [45]. Estos efectos se deben a que la radiación ultravioleta causa la degradación de proteínas de la matriz extracelular y la disminución de la ratio de renovación/síntesis de estas proteínas. Además, puede causar una disminución del grosor del estrato espinoso y del número de células de Langerhans, así como la pérdida de función de las fibras de la dermis. Por último, puede causar la reducción de melanocitos y desequilibrio de su densidad, lo que puede conllevar la aparición de manchas, incrementando el aspecto envejecido de la piel [15].

### **Radiación ultravioleta**

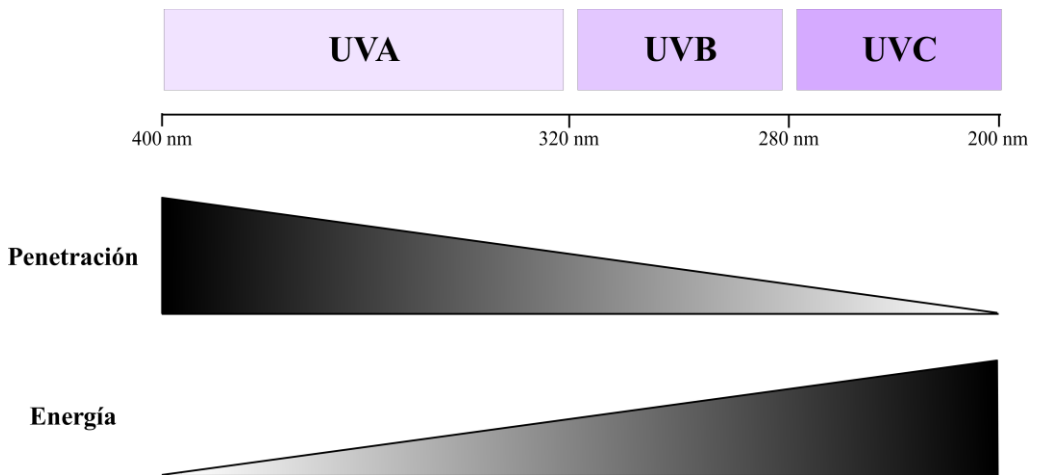
La radiación ultravioleta es la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida entre los 200 y los 400 nm. Se subdivide en las categorías **UVA**, **UVB** y **UVC** en función de sus propiedades electrofísicas (**Figura 7**). La **radiación UVC** comprende el rango de longitudes de onda entre 200 y 280 nm, es la categoría más energética y la que tiene menor capacidad de penetración. Es absorbida en la capa de ozono y, generalmente, no alcanza la superficie terrestre [46].

La **radiación UVB** comprende el rango entre 280 y 320 nm. Representa el 5% de la radiación UV que alcanza la superficie terrestre y es casi totalmente absorbida en la epidermis de la piel. Esta radiación es absorbida por el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células, lo que provoca modificaciones moleculares y la formación de



fotoproductos, como los dímeros de ciclobutano. La radiación UVB es la principal responsable de las quemaduras solares en la piel, además de generar estrés oxidativo y actuar como un agente genotóxico, lo que la convierte en la radiación ultravioleta más citotóxica y mutagénica [46, 47].

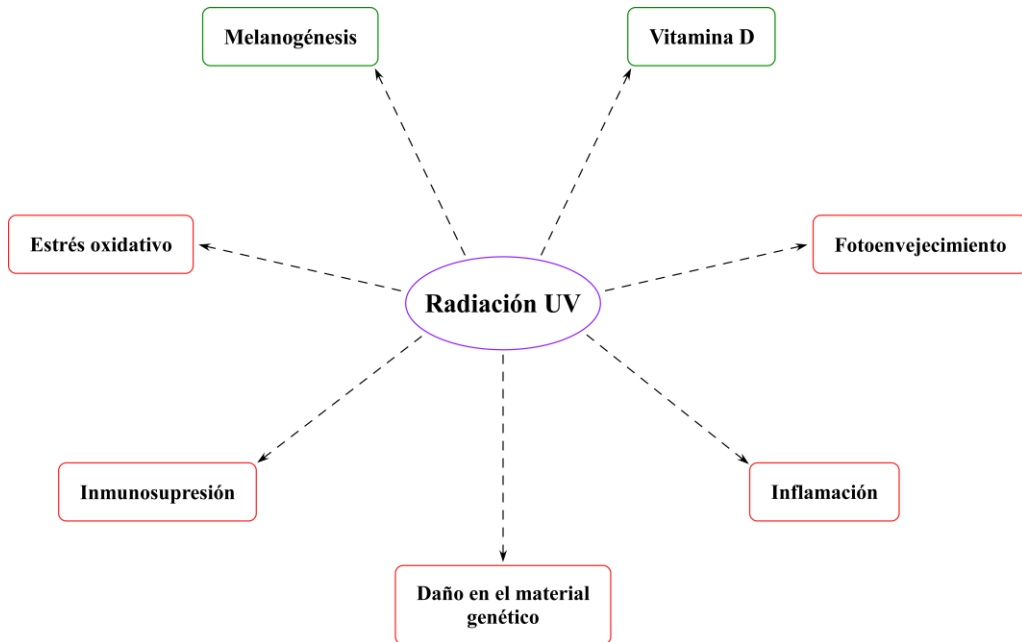
La **radiación UVA** comprende el rango entre 320 y 400 nm. Representa el 95% de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre. Esta radiación es la menos energética pero la que mayor capacidad de penetración tiene, ya que es capaz de alcanzar la dermis y es la principal causante del fotoenvejecimiento. El UVA puede actuar directamente sobre el ADN, produciendo dímeros de pirimidina en las células de la piel, y también genera radicales libres, lo que provoca estrés oxidativo [46, 48].



**Figura 7.** Radiación ultravioleta A, B y C y la relación inversamente proporcional de capacidad de penetración y energía.

La exposición crónica de la piel a la radiación UV es un factor desencadenante de diversas alteraciones de la piel, como son la inflamación, inmunosupresión, estrés oxidativo y fotoenvejecimiento, pudiendo todos ellos conllevar la aparición de enfermedades [49, 50]. La radiación ultravioleta puede aumentar el estrés oxidativo mediante la producción del anión superóxido, que deriva en peróxido de hidrógeno. Este peróxido, a su vez, forma el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton [51]. Todas estas moléculas participan en el estrés oxidativo del organismo, tal y como se verá más adelante en secciones posteriores de esta tesis doctoral.

A pesar de los efectos negativos descritos, la radiación ultravioleta también presenta algunos positivos, ya que induce la melanogénesis y es esencial para la síntesis de la vitamina D (**Figura 8**). De hecho, desde un punto de vista fisiológico, la inducción de la melanogénesis es un proceso fundamental, ya que protege de la radiación solar y de sus efectos dañinos. Sin embargo, desde un punto de vista cosmético la situación es diferente. En primer lugar, la melanogénesis excesiva, no regulada o focalizada, puede dar lugar a la aparición de manchas en la piel no deseadas. En segundo lugar, el aumento de la melanogénesis, entendida como un aumento en el tono de la piel u oscurecimiento de la misma, es un efecto deseado en países occidentales, mientras que, en los países asiáticos, el efecto deseado es justo el contrario, ya que se buscan productos blanqueantes que reduzcan la melanogénesis [52]. Estos dos efectos contrarios se pueden obtener mediante productos que inhiban o induzcan la enzima tirosinasa, que es una enzima esencial en el proceso de la melanogénesis, o bien modulando positiva o negativamente, según el caso, cualquiera de los otros participantes en la ruta de síntesis.



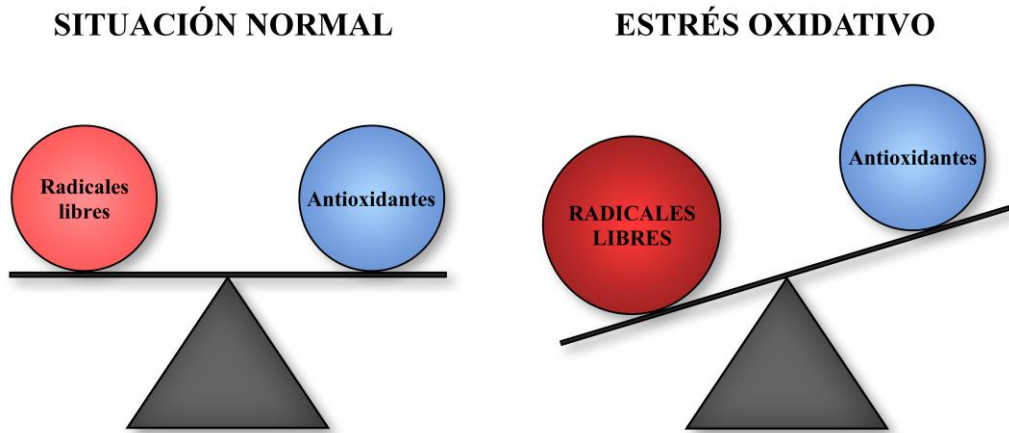
**Figura 8.** Principales efectos positivos (en verde) y negativos (en rojo) de la radiación ultravioleta. Basado en [57].

De cualquier manera, la producción de melanina es el mecanismo endógeno de defensa frente a la radiación UV más importante. La melanina absorbe la radiación, reduce la formación de fotoproductos y puede actuar como antioxidante [53, 54]. Como se ha comentado previamente, la melanina se produce en los melanocitos de la epidermis y posteriormente se transfiere a los queratinocitos que migran a las capas más externas de la piel. La radiación UV aumenta la síntesis de este pigmento mediante la inducción de la hormona estimuladora de melanocitos alfa y mediante el aumento del estrés oxidativo, que induce a la tirosinasa y proteínas relacionadas con la tirosinasa, siendo ambos factores melanogénicos. Además, tiene un efecto beneficioso en el tratamiento de trastornos dermatológicos, como en la dermatitis atópica o en la psoriasis

[55]. Sin embargo, un aumento desproporcionado y excesivo del estrés oxidativo podría conllevar la despigmentación en la piel, derivando en alteraciones de la melanina no deseadas tal y como ocurre con el vitíligo, además de otras consecuencias negativas [56].

### **Especies reactivas: estrés oxidativo y nitrosativo**

Las especies reactivas son moléculas muy pequeñas y altamente inestables debido a electrones desapareados. Son necesarias en el organismo, ya que actúan como segundos mensajeros, y son producidas de forma natural como consecuencia de procesos metabólicos que se producen en los organismos con metabolismo aeróbico. La concentración intracelular de los radicales libres del oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente, del inglés, *Reactive Oxygen/Nitrogen Species*) es controlada por el sistema antioxidante, compuesto por enzimas y otras moléculas que forman parte del sistema endógeno de defensa antioxidante [58]. La generación y eliminación de radicales libres en condiciones normales presenta un equilibrio, necesario para el buen funcionamiento del organismo. Sin embargo, la producción excesiva de especies reactivas debido a factores externos puede conllevar la pérdida de este equilibrio cuando el sistema antioxidante no es capaz de contrarrestar este aumento de especies reactivas, lo cual deriva en el estrés oxidativo o nitrosativo [59] (**Figura 9**). Estos factores externos son la radiación ultravioleta, agentes químicos, patógenos o la polución ambiental, entre otros (**Figura 10**).



**Figura 9.** En situación normal hay un equilibrio entre radicales libres y sistema antioxidante. Cuando hay un exceso de radicales libres el equilibrio se puede romper y generar estrés oxidativo.

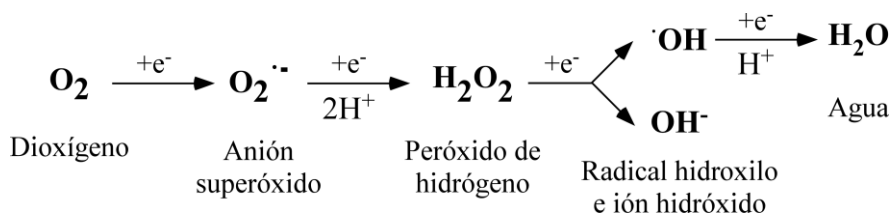


**Figura 10.** Algunos de los factores internos (metabolismo e inflamación) y externos (tabaco, radiación UV, polución ambiental y radiación ionizante) que inducen la formación de radicales libres en el organismo.

El aumento de ROS y RNS en la piel puede producir daños estructurales a los lípidos y proteínas debido a la oxidación y peroxidación que generan estas especies reactivas. Además, el aumento excesivo del estrés oxidativo puede generar inflamación, daño en el material genético, disfunción mitocondrial, envejecimiento e inmunosupresión [60, 61].

### Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las **especies reactivas de oxígeno** se pueden dividir en función de su origen. El oxígeno atómico (O), ozono (O<sub>3</sub>) y el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) se producen a partir de la rotura o excitación del oxígeno molecular. Por otro lado, el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (<sup>•</sup>OH) se producen por la adición de electrones a la molécula de oxígeno, en un proceso de reducción hasta que el radical hidroxilo se transforma en una molécula de agua (**Figura 11**).

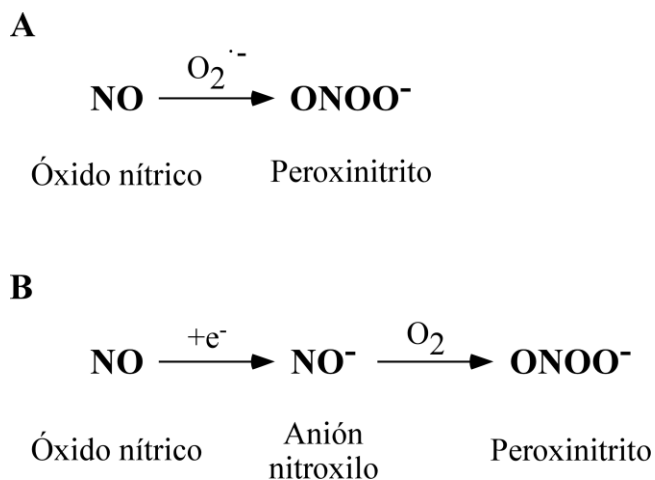


**Figura 11.** Producción de las distintas especies reactivas del oxígeno a partir de la molécula de oxígeno.

### Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

Por otro lado, las **especies reactivas del nitrógeno** pueden ser citotóxicas y producir estrés nitrosativo. Además, pueden producir daños estructurales en lípidos,

proteínas y material genético, de la misma forma que las especies reactivas del oxígeno [62]. Las principales especies reactivas son el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) por su gran reactividad y el óxido nítrico ( $\text{NO}$ ). El óxido nítrico es un radical libre sintetizado a partir del aminoácido L-arginina mediante las enzimas óxido nítrico sintasas, que se regulan mediante la concentración de calcio intracelular o bien pueden ser inducidas mediante otros factores como citoquinas. El radical óxido nítrico tiene poca reactividad, pero su importancia en el aumento del estrés nitrosativo radica en que es precursor de varias especies reactivas de nitrógeno, entre ellas el peroxinitrito, el radical dióxido de nitrógeno y el trióxido. El óxido nítrico puede generar peroxinitrito mediante la reacción con el anión superóxido (**Figura 12A**), o bien al ganar un electrón y formarse el anión nitroxilo, reacciona con una molécula de oxígeno para producir peroxinitrito (**Figura 12B**).



**Figura 12.** Producción del peroxinitrito. Vías de formación de este radical a partir del óxido nítrico mediante dos diferentes mecanismos, reaccionando con el anión superóxido (**A**), o bien formándose el anión nitroxilo tras la ganancia de un electrón y posteriormente reaccionando con oxígeno (**B**).

### Mecanismos de defensa antioxidante

Como se ha comentado previamente, los organismos disponen de mecanismos de defensa antioxidante para protegerse contra el estrés oxidativo y nitrosativo. Estos mecanismos se pueden dividir en dos grupos: los que provienen del propio organismo, llamados **endógenos**, y los que se adquieren con la dieta, llamados **exógenos**. En el **sistema antioxidante endógeno** participan enzimas, entre las que se encuentran la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa, y también participan moléculas no enzimáticas, como el glutatión.

El **sistema antioxidante exógeno** es especialmente relevante cuando se genera un estrés oxidativo superior al que el sistema endógeno puede contrarrestar. Esta situación puede suceder con enfermedades que reduzcan la capacidad del sistema antioxidante endógeno o cuando el organismo está expuesto a factores que aumentan excesivamente el estrés oxidativo. Este sistema exógeno se basa en las moléculas de actividad antioxidante que son ingeridas con la dieta o administradas de manera exógena. Entre estas moléculas destacan por su relevancia y prevalencia la vitamina C y E, así como los carotenoides y los polifenoles [63]. La adición de compuestos antioxidantes en la dieta es un buen mecanismo para ayudar a mantener el equilibrio oxidativo del organismo. Además, en el caso de la piel, el uso de productos cosméticos que contengan principios activos antioxidantes puede ayudar a combatir el estrés oxidativo excesivo producido por la exposición a la radiación ultravioleta. Estos principios activos pueden ser compuestos puros, pero también extractos naturales que contengan compuestos con capacidad antioxidante, como es el caso de los extractos vegetales y los polifenoles.



## **2.2 Protectores solares**

Los protectores solares se encuentran englobados dentro de los productos cosméticos para el cuidado de la piel. Se empezaron a comercializar en la década de 1930 [64]. Su principal objetivo es proteger de la radiación UV, especialmente de la UVB. La eficiencia de los protectores solares se determina mediante el factor de protección solar (FPS) y del grado de protección del UVA. El parámetro que se utiliza internacionalmente es el FPS, que especifica el tiempo que tarda la radiación UVB en causar un eritema en la piel cuando se utiliza protección solar respecto a lo que tardaría sin protección solar [65].

Los protectores solares contienen filtros solares que aportan una barrera física que refleja y dispersa la radiación solar, así como pueden aportar una barrera química que absorbe esta radiación [66]. Además, los protectores solares pueden tener otros compuestos beneficiosos como antioxidantes o enzimas reparadoras del material genético, que pueden detener las consecuencias negativas de la radiación UV y limitar el daño en la piel. Los protectores solares deben proteger de los efectos perjudiciales de la radiación solar de la forma más completa posible, lo cual incluye la combinación de filtros solares y de otros compuestos activos que reduzcan el daño que el UV genera. Además, dada la limitación de los compuestos en solitario para cubrir todo el espectro de absorción del UV, la combinación de diferentes principios activos presenta un valor adicional, ya que la eficacia del filtro depende de las características de absorción de cada uno de los compuestos que actúan como filtros del UV [67, 68].

Los filtros solares se utilizan mayoritariamente en protectores solares, pero también se encuentran en otros productos cosméticos, como en maquillaje, pintalabios o perfumes [69]. Se dividen en filtros físicos (inorgánicos) y químicos (orgánicos) (**Figura 13**). Los inorgánicos más conocidos son el óxido de zinc y el dióxido de titanio, actúan principalmente reflejando y dispersando la radiación y, en mucha menor medida, también absorben el UV [70]. El óxido de zinc protege en el rango del UVA, mientras que el dióxido de titanio protege en el rango del UVB y parte del UVA [71].

A su vez, los filtros orgánicos o químicos se dividen en derivados de ácido paraaminobenzoico, derivados de alcanfor, benzofenonas, salicilatos y cinamatos, entre otros [72]. Los ejemplos más conocidos y usados son la oxibenzona, avobenzona y octocrilo. Muchos de estos grupos tienen compuestos aromáticos conjugados con grupos carbonilo. Estos compuestos actúan absorbiendo la radiación ultravioleta. Los electrones de sus bencenos se excitan, absorbiendo la radiación UV, y disipan la energía en forma de calor o emitiendo energía en una mayor longitud de onda [70].

FÍSICOS	QUÍMICOS
<p><b>Función principal:</b> Dispersan radiación UVA y UVB</p>	<p><b>Función principal:</b> Absorben radiación UV</p>
<p>No resistentes al agua</p>	<p>Resistentes al agua</p>
<p>Hipoalergénicos</p>	<p>No hipoadergénicos</p>
<p>Actuación inmediata</p>	<p>Tardan en hacer efecto</p>
<p>Filtro más grueso</p>	<p>Filtro fino</p>

**Figura 13.** Comparación de filtros físicos y químicos.

En general, los protectores solares deben ser resistentes al agua, hipoalergénicos, fotoestables, no deben penetrar en la piel y deben evitar los daños de la radiación solar sin generar compuestos perjudiciales. Además, los protectores solares suelen combinar filtros orgánicos e inorgánicos para proteger en todo el rango del espectro del UVA y del UVB, así como otros compuestos activos con otras actividades beneficiosas, como ya se ha comentado previamente [70, 71, 73]. Actualmente existe una tendencia hacia la búsqueda de protectores solares de origen natural que no dañen al ecosistema marino, debido a la reciente prohibición del uso de estos productos en algunas playas e islas del Caribe, Australia o EE. UU. por el daño que producen los filtros químicos a los corales. Compuestos como la oxibenzona, el octocrileno y el octinoxato, tres agentes químicos que bloquean la radiación UV, se encuentran en la mayoría de estos productos y dañan los corales y ecosistemas marinos, por lo que el desarrollo de nuevos protectores solares que eviten o reduzcan este perjuicio tienen un valor adicional [74]. Por todos estos motivos, los extractos naturales tienen un gran potencial para ser utilizados como principios activos de protectores solares.

### **3. Extractos naturales y metabolitos secundarios de plantas**

Los extractos naturales tienen diversas características que los hacen útiles en la industria cosmética en comparación con los compuestos de origen químico, ya que la sociedad valora a los productos de origen natural de forma más positiva que a los sintéticos [75].

Además, la industria alimentaria se caracteriza por generar una gran cantidad de residuos, lo cual tiene un importante impacto económico y tiene riesgos ambientales asociados, como la liberación de gases en los vertederos [76]. Debido a esto, el uso de materia prima residual de la industria horto-frutícola tiene un valor añadido, ya que reduce la cantidad de desperdicios y, a su vez, aporta una nueva utilidad a esta materia. Por ello, también reduce los costes, aumenta los ingresos, fomenta la economía circular y promueve el cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible, en concreto los objetivos 3, 11 y 12: salud y bienestar, producción y consumo responsables y desarrollo de ciudades y comunidades sostenibles (**Figura 14**).



**Figura 14.** Objetivos de desarrollo sostenible promovidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU).

Los **extractos naturales** de origen vegetal presentan propiedades nutricionales, fitoquímicas y farmacológicas con beneficios potenciales para la salud, y han sido

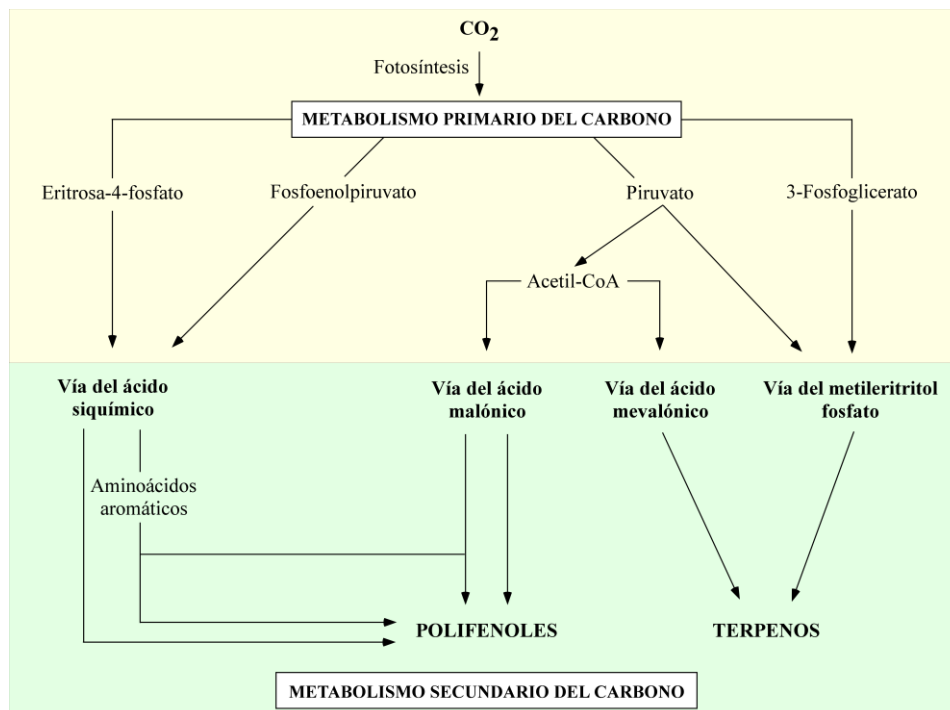
ampliamente utilizados en la medicina tradicional, en la industria farmacéutica y cosmética. Numerosos extractos vegetales han demostrado una capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral y antienvjecimiento, entre otras [77, 78]. Esto se debe a que los extractos vegetales presentan una gran variedad de compuestos, lo cual favorece que actúen en diferentes dianas y mediante diversos mecanismos moleculares, permitiendo la sinergia entre los distintos compuestos. Las diferentes actividades descritas se deben principalmente a los metabolitos secundarios de las plantas presentes en dichos extractos [79].

En el **metabolismo primario** se incluyen los procesos que intervienen de forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Las moléculas resultantes de este metabolismo son los glúcidos, lípidos y proteínas.

En cambio, los **metabolitos secundarios** son los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones ajenas al metabolismo primario. Estos compuestos aportan color, aroma, textura y cumplen funciones de defensa frente a diferentes daños como los radicales libres, patógenos o radiación ultravioleta. Los metabolitos secundarios se dividen en polifenoles, terpenoides, alcaloides y fitoquímicos con sulfuro.

### **Polifenoles**

Los polifenoles son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas y son sintetizados a partir de dos rutas primarias: la del **ácido siquímico** y la del **ácido malónico** [80] (**Figura 15**).



**Figura 15.** Vías del metabolismo primario y secundario del carbono implicadas en la producción de polifenoles y terpenos. Dibujado a partir de [81].

Los polifenoles son compuestos formados por uno o más anillos aromáticos con al menos un hidroxilo. El número y tipo de las sustituciones son las que diferencian a los polifenoles en diferentes clases y subclases, aportando la gran variabilidad estructural que les caracteriza [82]. Los grupos hidroxilo les permiten actuar como donadores de protones, actuando como antioxidantes en los vegetales. Además, participan en funciones de defensa de la planta ante situaciones de estrés y otros factores.

Los polifenoles tienen diversos efectos beneficiosos, tanto ingeridos en la dieta como utilizados en diferentes productos como principios activos. Muchos de ellos son pigmentos que pueden absorber la radiación UV y actuar como protectores solares [50].



### Flavonoides

Los **flavonoides** son el principal grupo de los polifenoles. Se sintetizan mediante la vía fenilpropanoide. Presentan estructuras C6-C3-C6 y un heterociclo con 6 oxígenos. Se subdividen en flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas y antocianidinas [82, 88]. Dentro de los flavanoles se incluyen las catequinas y los taninos condensados, que son polímeros de flavanoles. Como se ha comentado ya anteriormente, muchos de estos flavonoides poseen relevantes actividades biológicas como la actividad antioxidante y la anticancerígena, entre otras [89, 90].

### Estilbenos

Los **estilbenos** presentan una estructura en la que dos grupos fenilo están conectados por un puente de metileno. Presentan diferentes efectos, entre los que se encuentran la actividad antioxidante y antienvjecimiento [91-93].

### Ácidos fenólicos

Los **ácidos fenólicos** suelen tener azúcares esterificados o ácidos orgánicos. Además, se sintetizan mediante la vía siquímica. Se subdividen en ácidos hidroxibenzoicos, que derivan del ácido benzoico y tienen una estructura C6-C1, y ácidos hidroxicinámicos, que provienen del ácido cinámico y tienen una estructura C6-C3 [94]. Algunos ácidos fenólicos tienen una actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antiviral [95, 96].



## Lignanos

Los **lignanos** son dímeros de fenilpropanoide (C6-C3) [97]. Algunos lignanos pueden actuar como fitoestrógenos y presentan una actividad antitumoral frente al cáncer de mama [98]. Además, algunos lignanos han mostrado actividad frente al Alzheimer y de protección frente a la radiación ultravioleta [99].

## **Terpenoides**

Los terpenoides, también llamados terpenos o isoprenoides, representan la clase más diversa de los compuestos producidos por las plantas. Son esenciales en varios procesos metabólicos, incluyendo la biosíntesis de la pared celular, las modificaciones postraduccionales de proteínas y la señalización. Además, tienen actividades propias de metabolitos secundarios, aportan las características organolépticas de la planta y actúan como defensa frente a insectos, animales herbívoros y temperatura. Los terpenoides han sido ampliamente utilizados en productos saborizantes, fragancias, farmacéuticos e insecticidas [100, 101].

Los terpenos son moléculas pequeñas y volátiles. Están formados por la unión de varias moléculas de isopreno, y pueden tener estructuras lineales o cíclicas. Se sintetizan a partir de dos vías: la vía del ácido mevalónico en el citosol de la planta y la vía del metileritritol fosfato (MEP) que se realiza en los orgánulos celulares plastos.

Atendiendo a la clasificación de Otto Wallach en función del número de átomos de carbono y de unidades de isopreno que lo conforman, los terpenoides se clasifican

en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos [102] (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Clasificación de los terpenos en función del número de átomos de carbono y de isopreno.

Grupo	Nº de átomos de carbono	Nº de unidades de isopreno
<b>Hemiterpenos</b>	5	1
<b>Monoterpenos</b>	10	2
<b>Sesquiterpenos</b>	15	3
<b>Diterpenos</b>	20	4
<b>Sesterterpenos</b>	25	5
<b>Triterpenos</b>	30	6
<b>Tetraterpenos</b>	40	8
<b>Politerpenos</b>	5n	n

Además de metabolitos secundarios, los extractos vegetales están compuestos por otras moléculas, como son los ácidos orgánicos y derivados de ácidos grasos. Los ácidos orgánicos presentan actividad cuando tienen varios radicales alquilo y son usados como conservantes en la industria cosmética. Los más importantes son el ácido benzoico, el ácido propiónico, el ácido salicílico, el ácido sórbico, el ácido dehidroacético, el ácido fórmico, el ácido undecilénico, el ácido cítrico y el hidroximetilaminoacetato de sodio. Los ácidos orgánicos pueden inhibir el crecimiento de microorganismos mediante diferentes mecanismos: acidificando el medio externo o el citoplasma bacteriano,

modificando la fluidez de la membrana plasmática, inhibiendo enzimas del metabolismo celular o eliminando nutrientes esenciales [103].

Los extractos vegetales también pueden contener ácidos grasos o derivados de interés. Como ejemplos de derivados de ácidos grasos con actividad cosmética, el ácido linoleico se utiliza como blanqueante de zonas de la piel hiperpigmentadas [104]. Una formulación de uso tópico con varios ácidos grasos insaturados previene la degradación de la matriz extracelular y mejora la producción de colágeno y elastina, presumiblemente debido a la modulación del estrés oxidativo [105]. Por otro lado, el ácido eicosapentaenoico protege frente a la degradación del colágeno inducida por la radiación UV en un modelo celular de piel [106]. Estos dos compuestos y la formulación son ejemplos de posibles candidatos para ser utilizados como principios activos en productos cosmecéuticos, ya que presentan actividades relacionadas con la cosmética. Además, los extractos ricos en ácidos grasos insaturados con actividad antimicrobiana pueden utilizarse en los productos dermocosméticos como conservantes, reemplazando a los antibacterianos actuales [107].

De esta forma, el estudio y producción de nuevos extractos vegetales son métodos viables de obtención de principios activos para el desarrollo de nuevos productos cosmecéuticos. Es de especial interés la obtención de extractos que inhiban las enzimas que participan en el envejecimiento celular (colagenasa, elastasa, hialuronidasa y el proceso de glicación); extractos con actividad antioxidante, principalmente debido a los polifenoles; extractos con capacidad de fotoprotección, y extractos que induzcan o

inhiban la melanogénesis, ya que el aumento de melanina es un efecto deseado en países europeos, mientras que en países asiáticos se buscan productos blanqueantes [52].

### **3.1 Aprovechamiento de residuos de la industria frutícola como subproductos**

La industria hortofrutícola genera grandes cantidades de residuos. Se estima que un 30-50% de la materia prima obtenida en esta industria es descartada. En Europa, el tratamiento de un metro cúbico de materia sólida puede costar entre 24 y 50 dólares, incluyendo transporte, manipulación y almacenamiento. Debido a la humedad de los residuos de frutas, se suelen utilizar vertederos, lo cual se asocia con la emisión de gases de efecto invernadero y un mayor impacto medioambiental [76].

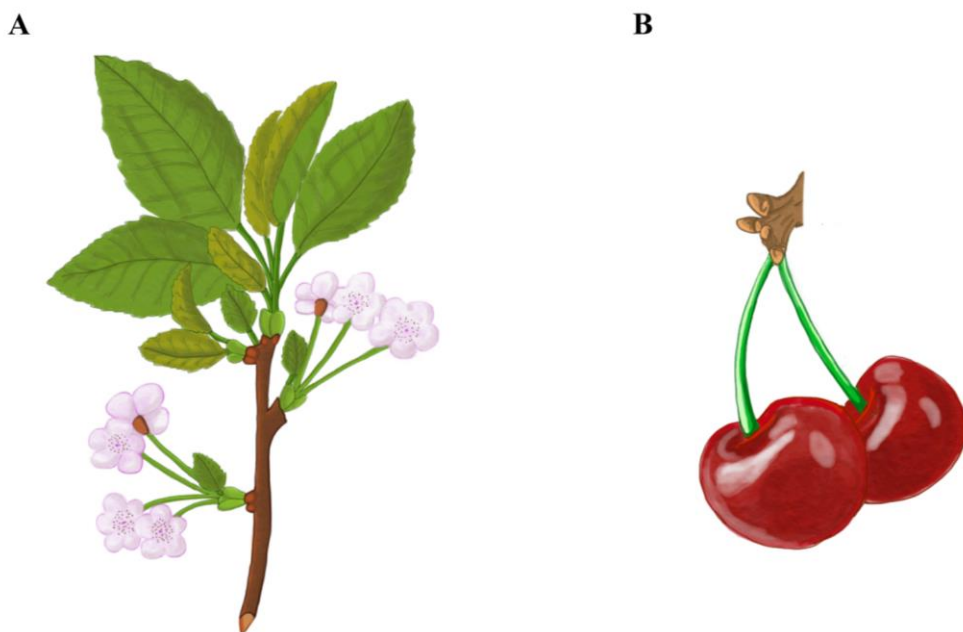
El estudio y uso de partes vegetales que se obtienen como desechos en la industria frutícola presenta ventajas económicas y ecológicas. Pueden ser utilizados para la producción de biogás o como fuente de compuestos bioactivos, entre otros. Las distintas partes vegetales de las plantas que se obtienen como desechos de esta industria, principalmente hojas, tallos, semillas y cortezas, tienen diferentes compuestos bioactivos, como son los flavonoides, pectinas, lípidos o fibras. Debido a esto, son potenciales fuentes de compuestos bioactivos que pueden ser utilizados como ingredientes en productos nutracéuticos, cosméticos, suplementos alimenticios y prebióticos, entre otros. El aprovechamiento de esta materia para el desarrollo de subproductos conlleva, además, una mejora del impacto económico y ambiental que genera esta industria [76].

### 3.2 Extractos de rabo de cereza como fuentes de compuestos bioactivos

El cerezo (*Prunus avium* L.) pertenece a la familia de las rosáceas. Este árbol es originario de Grecia, aunque actualmente se distribuye en todo el mundo. En Europa se cultiva en Grecia, España, Italia, Polonia, Hungría y Alemania [108].

El cerezo es un árbol de hoja caduca, puede llegar a los 25 metros de altura y 60 centímetros de diámetro. Tiene una corteza lisa y de color marrón con tonos rojizos. Sus hojas son ovaladas con borde aserrado y pueden llegar hasta 12 centímetros de longitud. Presenta floración tardía, en abril/mayo, lo que le aporta tolerancia al frío. Las flores son blancas, con cinco pétalos. El fruto de este árbol es la cereza, de tipo drupa, y se desarrollan pasados dos meses de la floración (**Figura 17**). En España se cultivan distintas variedades, principalmente en la región Valle del Jerte, que cuentan con Denominación de Origen Protegida [109].

La cereza es un fruto muy valorado por los consumidores por sus propiedades organolépticas y nutricionales que se obtiene en los frutos, zumos o bebidas alcohólicas. En la cereza, los polifenoles más abundantes son los antocianos, pero también hay ácidos fenólicos como los hidroxicinámicos y flavonoles [110, 111]. Estos compuestos presentes en la cereza le otorgan diversas actividades beneficiosas, como son la actividad antioxidante y antiinflamatoria [111-113]. La actividad antioxidante y el contenido fenólico de la cereza se ven afectados por factores climáticos como son la temperatura y la intensidad solar, entre otros factores ambientales. Estos factores modifican la actividad de una de las enzimas responsables de la acumulación de antocianos y otros compuestos fenólicos en el fruto de la cereza [11].



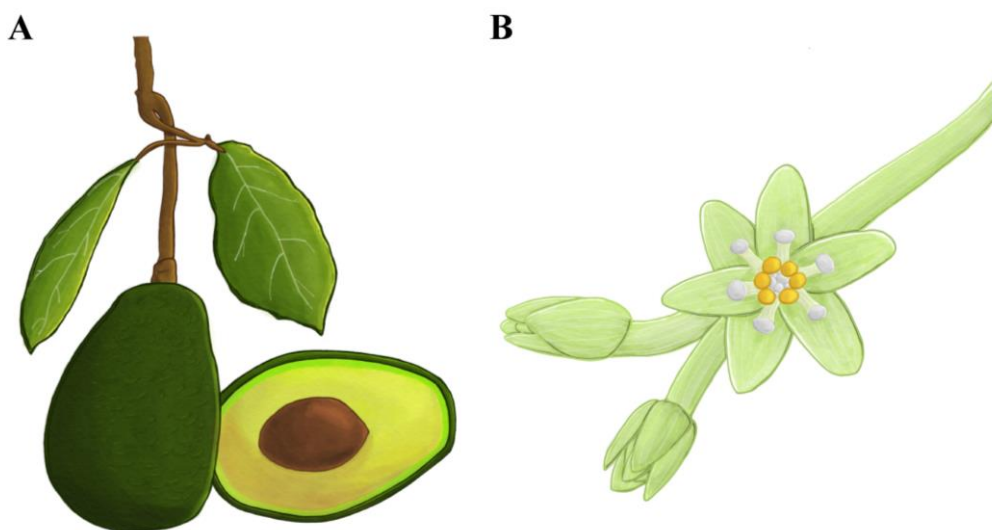
**Figura 17.** Rama de cerezo con hojas y flores (A) y fruto del cerezo (B).

Además de la cereza, las diferentes partes de este árbol presentan actividades que son interesantes como posibles fuentes de compuestos bioactivos. Fábio *et al.* identificaron 26 compuestos fenólicos en extractos de hojas, flores y rabos de cereza, siendo los compuestos mayoritarios el ácido 5-*O*-cafeoilquínico, el derivado 1 del ácido hidroxicinámico y el de sakuranetina, respectivamente. Estos extractos mostraron actividad antioxidante frente a diferentes radicales libres y peroxidación lipídica [114]. Además, Nastić *et al.* caracterizaron dos extractos de rabo de cereza, obtenidos mediante dos métodos diferentes de extracción. Estos extractos presentaron hasta 42 compuestos diferentes, entre los que destacaron los fenoles y los ácidos grasos y derivados [115].

### 3.3 Extractos de aguacate como fuentes de compuestos bioactivos

El aguacatero (*Persea americana*) pertenece a la familia de las lauráceas. Es un árbol originario de Centroamérica, pero actualmente se cultiva en zonas tropicales y mediterráneas. El mayor productor es México y se cultivan más de 3 millones de toneladas en todo el mundo.

Este árbol puede medir de 9 a 20 metros de altura. Sus hojas miden entre 7 y 41 centímetros y pueden tener forma elíptica, ovalada o lanceolada. Las flores son de color verde amarillento y presentan inflorescencias. El fruto es el aguacate, una baya que consta de una sola semilla grande, rodeada por una pulpa y con una piel variable en grosor y textura [116] (**Figura 18**).



**Figura 18.** Representación de una rama de aguacate con hojas y fruto (A) y sus flores (B).

Sus propiedades nutricionales y composición bioquímica le han otorgado una gran popularidad, siendo una fruta ampliamente utilizada en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Se puede obtener una gran variedad de compuestos mediante la extracción de las diferentes partes del aguacate, incluyendo piel, pulpa y semilla. Estos compuestos se agrupan principalmente en ácidos grasos, derivados de furano y de lignano, carotenoides, carbohidratos, diterpenos y otros compuestos. Los compuestos polifenólicos obtenidos del aguacate son el ácido vanílico, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido  $\rho$ -cumárico, ácido ferúlico, ácido neoclorogénico y (E)-clorogénico, proantocianidina A1, B1 y B2,  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, catequina y epicatequina, quercetina y 4-hidroxicinamoilputresceína. Los diterpenos presentes de manera más importante en el aguacate son el vignaticol, rianodol, perseanol, 2,3-didehidrocinceilanona, garajonona, anidrocinceilanona e indicol [117].

En la producción industrial de aguacates y productos derivados del mismo, como el guacamole, se suelen utilizar exclusivamente las pulpas, mientras que las semillas y la piel son desechadas. Estos residuos son ricos en polifenoles y otras moléculas bioactivas, principalmente taninos, ácidos fenólicos, flavonoides y catequinas [118].

Los compuestos fenólicos y ácidos grasos obtenidos de la semilla y piel de aguacate presentan actividad antioxidante y antimicrobiana [119-121]. Estas propiedades son interesantes para la industria cosmética, por lo que la obtención de extractos de semilla y piel de aguacate con compuestos bioactivos podría ser aprovechada para el desarrollo de nuevos productos cosméticos.



## **HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS**



Extractos de diferentes fuentes vegetales estudiados en el grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral presentan propiedades interesantes para el desarrollo de productos cosméticos. Entre estas actividades se incluye la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de diferentes variedades de *Cistus* [122], la actividad fotoprotectora y antienvjecimiento de un extracto de romero y pomelo [123], o un extracto de *Melissa officinalis* que promueve la melanogénesis y protege frente a la radiación ultravioleta, entre otros [51].

Además, la bibliografía muestra evidencias de la actividad beneficiosa para la industria cosmética de extractos de rabo de cereza y de piel y semilla de aguacate. Por lo tanto, estas materias primas son potenciales fuentes de principios activos para el desarrollo de productos dermocosméticos.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la **obtención y caracterización de nuevos ingredientes cosméticos a partir de extractos naturales de rabo de cereza y aguacate**. Para ello, dentro de este objetivo se incluye el estudio comparativo de 3 extractos de rabo de cereza, obtenidos mediante tres técnicas de extracción distintas, así como de 6 extractos de aguacate, 3 de piel y 3 de semilla de aguacate, obtenidos a tres temperaturas de secado diferentes mediante una única técnica de extracción. La finalidad de este estudio es determinar si estos extractos tienen actividades útiles como principios activos para la industria dermocosmética y, en su caso, determinar cuáles son los que presentan las características óptimas para ser aprovechados en un nuevo producto para el cuidado de la piel.

Para el desarrollo de este objetivo principal se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar los 3 extractos de rabo de cereza y los 6 de aguacate e identificar los compuestos obtenidos.
2. Determinar el contenido fenólico, actividad antioxidante y actividad enzimática relacionada con la actividad cosmética *in vitro*.
3. Evaluar la capacidad de inducción de melanogénesis y fotoprotección frente a la radiación ultravioleta en modelos celulares.
4. Realizar un estudio comparativo de los distintos extractos en base a los resultados obtenidos.
5. Seleccionar, mediante sucesivas etapas de cribado, los candidatos que presenten el mayor potencial para el desarrollo de un producto cosmético.

## **METODOLOGÍA**



## 1. Materia prima para la obtención de extractos naturales

La materia prima de los extractos de rabo de cereza, *Prunus avium*, fue suministrada por un productor de cereza (La Picota del Jerte, España). Fue recolectada en mayo de 2015 e inmediatamente después fue secada por aire hasta una humedad del 12%. Posteriormente, se redujo a un polvo fino mediante la centrifugación a 6.000 revoluciones por minuto (rpm) utilizando el equipo Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Alemania), equipado con un rotor de 12 dientes y un tamiz de anillo con un agujero trapezoidal de 1 milímetro. El polvo resultante fue almacenado a temperatura ambiente y oscuridad hasta su posterior extracción. Esta extracción fue llevada a cabo mediante tres técnicas diferentes: extracción con solvente a presión (extracto scPLE), extracción por fluidos supercríticos (extracto scSFE) y extracción por agua subcrítica (extracto scSWE). Dichas técnicas se detallan en apartados posteriores.

Las pieles y semillas de aguacate se obtuvieron de aguacates frescos variedad Haas proporcionados por el grupo comercial La Caña, Miguel García Sánchez e Hijos, S.A. (Motril, España). Los frutos se cosecharon en la costa subtropical de Granada y se dejaron madurar a temperatura ambiente. Posteriormente, la pulpa se separó manualmente de la semilla y la piel bajo un flujo continuo de agua corriente. Luego, los subproductos semilla y piel de aguacate se secaron en un horno (Memmert UNE 200, Memmert, Alemania) a diferentes temperaturas: 45, 65 y 85 °C. Para el proceso de secado, las pieles se cortaron en trozos de 4 x 4 centímetros aproximadamente. En el caso de las semillas el secado se realizó en dos pasos, primero con la semilla completa y cuando se pudo separar la cubierta se cortó en rodajas. Las muestras se secaron hasta

un contenido de humedad final de menos del 10% y se molieron obteniendo un polvo con un tamaño medio de partícula de 500  $\mu\text{m}$  en un molino de ultracentrífuga ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Alemania). Los materiales obtenidos se almacenaron evitando la exposición a la luz y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su posterior extracción mediante la técnica de extracción con solvente a presión.

## **2. Procesos de extracción**

### **2.1 Extracción con solvente a presión (PLE)**

La extracción con solvente a presión (PLE) se llevó a cabo utilizando un extractor con solvente acelerado Dionex ASE 350 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, EE. UU.) [115].

El extracto de rabo de cereza scPLE se extrajo mediante este método. Para ello, se mezclaron 6 gramos de polvo de rabo de cereza con 12 gramos de arena de mar (Fisher Scientific, Madrid, España) y se envasó en una celda de extracción de acero inoxidable de 34 mL. La extracción se realizó en modo estático durante 20 minutos a 10 MPa y se utilizó un disolvente compuesto por etanol:agua (1:1, v/v) a una temperatura de 40 °C.

Los 6 extractos de aguacate, 3 de piel y 3 de semilla, también se obtuvieron mediante este método de extracción. Se mezclaron homogéneamente 1,5 gramos de la muestra secada con 5 gramos de arena. La extracción fue realizada a una presión constante de 11 MPa con modo estático y un ciclo de 20 minutos. Se realizó a 200 °C



usando agua para los extractos de semillas de aguacate y una mezcla de etanol:agua (1:1, v/v) para los extractos de piel de aguacate.

El extracto scPLE de rabo de cereza y los 6 de aguacate se recogieron en viales y se evaporaron mediante vacío a temperatura ambiente utilizando el concentrador SpeedVac Savant SC250EXP (Thermo Scientific, Leicestershire, Reino Unido). Posteriormente, se almacenaron a -20 °C y se protegieron de la exposición a la luz solar hasta el posterior análisis. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

## **2.2 Extracción con fluido supercrítico (SFE)**

La extracción con fluido supercrítico SFE-CO<sub>2</sub> del extracto scSFE de rabo de cereza se realizó mediante un sistema de extracción Waters Prep (SFE-100) [10]. Para realizar la extracción, se mezclaron 5 gramos de polvo de rabos de cereza con arena de mar en una proporción de 1:2. La etapa del fluido supercrítico se llevó a cabo en un modo dinámico a 40 °C usando una velocidad de flujo total de 22 g/min de CO<sub>2</sub> y 15% de etanol y una presión de 150 bar durante 1 hora. El extracto recogido se concentró en un baño de agua a 40 °C usando un evaporador rotatorio y se reconstituyó en etanol hasta una concentración de 1000 mg/L. Por último, se filtró utilizando filtros de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.) y se almacenó a -20 °C hasta el análisis.

### **2.3 Extracción con agua subcrítica (SWE)**

La extracción SWE del extracto de rabo de cereza scSWE se realizó utilizando un extractor de agua subcrítica con un recipiente de acero inoxidable de alta presión con 1,7 L de capacidad. Este equipo fue diseñado y elaborado por ingenieros para el grupo de investigación del Dr. Antonio Segura, en el Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF) de Granada [124]. La muestra se extrajo durante 30 minutos a una presión de 20 bar, una temperatura de 150 °C y una velocidad de agitación de 3 Hz, con una relación muestra:agua de 1:90. Se usó un baño de agua de flujo continuo a 20 °C para enfriar el recipiente inmediatamente después de la extracción. Posteriormente, el sistema se despresurizó y se purgó con nitrógeno puro. El extracto se filtró como se ha comentado anteriormente, se evaporó al vacío y se almacenó en refrigeración hasta el análisis.

### **3. Análisis de los extractos por HPLC-ESI-QTOF-MS**

Los 9 extractos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con electrospray y analizador de tiempo de vuelo (HPLC-ESI-TOF-MS). Para ello, se utilizó el cromatógrafo Agilent 1260 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) equipado con una bomba binaria, un desgasificador en línea, un muestreador automático controlado por termostato y compartimentos de columna, así como un detector de matriz de diodos.

Las muestras se separaron en una columna Agilent ZorBax Eclipse Plus C18 (1,8  $\mu\text{m}$ ,  $4,6 \times 150$  mm) protegida por un cartucho protector del mismo empaque. En el caso de los extractos de rabo de cereza, las fases móviles consistieron en agua con ácido fórmico (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) al 0,1% como eluyente A y acetonitrilo (Fisher Scientific, Madrid, España) como eluyente B con el siguiente programa de elución: 0 min, 5% B; 15 min, 65% de B; 36 min, 95% de B; 40 min, 5% de B, y finalmente un ciclo de acondicionamiento de 5 minutos en las mismas condiciones para el próximo análisis.

En el caso de los extractos de aguacate, las fases móviles fueron agua acidificada con 0,1% de ácido fórmico (v/v) y acetonitrilo con una ratio de flujo constante de 0,5 mL/min, usando el siguiente gradiente: 0 min, 95% A; 25 min, 50% A; 33 min, 0% A; y por último un ciclo desde 36 min hasta 40 min con las condiciones iniciales antes de la siguiente inyección.

El volumen de inyección para todos los extractos se ajustó a 10  $\mu\text{L}$ , la temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y las muestras se refrigeraron a 4 °C.

La detección se realizó dentro de un rango de masa de 100-1700 m/z en modo de iones negativos utilizando el espectrómetro de masas Cuadrupolo-Tiempo de vuelo (Q-TOF) de ultra alta precisión (UHD) Agilent 6540 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con una interfaz Jet Stream dual ESI.

Los parámetros de funcionamiento para los extractos de rabo de cereza fueron los siguientes: velocidad de flujo de gas de secado, 10 L/min; temperatura del gas de

secado, 325 °C; nebulizador, 20 psi; capilar, 4.000 V; fragmentador, 130 V. Se usó nitrógeno como gas de secado y nebulización.

En el caso de los extractos de aguacate, los parámetros fueron los siguientes: temperatura de nitrógeno de secado, 325 °C con un flujo de 10 L/min; presión del nebulizador, 20 psi; temperatura del gas de revestimiento, 400 °C con un flujo de 12 L/min; tensiones de radiofrecuencia capilar, boquilla, fragmentador, espumadera y octopolo, 4.000, 500, 130, 45 y 750 V, respectivamente.

Además, se realizó un análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para la identificación de los compuestos detectados en los extractos de aguacate. Para este propósito, se utilizó nitrógeno como gas de colisión con los siguientes valores de energía de colisión: 10 eV, 20 eV y 40 eV.

La infusión continua de los iones de referencia  $m/z$  112,985587 (anión trifluoroacetato) y 1033,988109 [aducto de hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxi) fosfazina] se usó para corregir cada espectro de masa. Ambos iones de referencia proporcionaron una medida de masa precisa mejor que 2 partes por millón (ppm).

Todas las operaciones, la adquisición y el análisis de datos fueron controlados por la versión de software B.06.00 de la estación de trabajo Masshunter (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.).

Para la determinación analítica de los extractos de aguacate se utilizaron distintos patrones comerciales. El ácido dihidrocafeico, el dímero de procianidina A2 y el trímero B2 fueron adquiridos de Extrasynthese (Genay Cedez, Francia). El ácido benzoico, (+)-

catequina, ácido clorogénico, ácido cítrico, ácido *p*-cumárico, (-)-epicatequina, ácido gentísico, (±)-naringenina, neohesperidina, ácido protocatechuico, quercetina, rutina y quercetina-3- $\beta$ -glucósido fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Por último, el ácido 4-hidroxibenzoico fue obtenido de Fluka Chemika (Buchs, Suiza) y el ácido quínico de Acros Organics (Geel, Bélgica).

Los compuestos correspondientes a los estándares se cuantificaron en base a sus propias curvas, y para los demás compuestos se utilizó la curva del compuesto con el que presentasen una mayor similitud estructural. Por lo tanto, la curva de calibración de catequina se utilizó para cuantificar los derivados de catequina, 5-*O*-cafeoilquínico se aplicó para los ácidos fenólicos y los derivados de alcohol fenólico, la procianidina A2 se empleó para las procianidinas tipo A, mientras que la procianidina B2 para las procianidinas tipo B, y finalmente los demás flavonoides se cuantificaron en función del compuesto rutina.

#### **4. Estudio de la bioactividad de los extractos**

##### **4.1 Condiciones de preparación de los extractos**

Los extractos de rabo de cereza obtenidos mediante las técnicas de extracción SFE, PLE y SWE fueron nombrados como scSFE, scPLE y scSWE y disueltos en EtOH, EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1) y H<sub>2</sub>O, respectivamente.

En cuanto a los extractos de aguacate, fueron nombrados en función de la temperatura de secado de 45, 65 y 85 °C como S45, S65 y S85, en el caso de los extractos

de semilla y P45, P65 y P85 en el caso de los extractos de piel de aguacate. Los 6 extractos fueron disueltos en EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1) a la concentración requerida. Para los ensayos celulares, los extractos de rabo de cereza y aguacate fueron preparados y disueltos diariamente a 30 mg/mL en dimetil sulfóxido (DMSO).

#### 4.2 Determinación del contenido fenólico mediante el ensayo Folin-Ciocalteu

Se determinó el contenido fenólico de los 3 extractos de rabo de cereza y los 6 de aguacate mediante el ensayo Folin-Ciocalteu, utilizando el ácido gálico como estándar [125-127]. Para ello, se añadió en orden 50 µL del reactivo Folin, 10 µL de la muestra, 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% (p/v) y 840 µL de agua destilada. Por último, tras una incubación de 20 minutos se midió la absorbancia a 700 nm en el lector de placas SPECTROstar Omega (BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania) (**Figura 19**). El contenido fenólico de los extractos fue determinado como equivalentes de ácido gálico en porcentaje (% GAE) a partir de la recta del estándar.



**Figura 19.** Lector de placas SPECTROstar Omega.

### **4.3 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos mediante diversos ensayos antioxidantes**

Se determinó la capacidad de los extractos de reducir el estrés oxidativo mediante diferentes mecanismos. Estos mecanismos incluyeron la capacidad de reducir el radical ABTS (ensayo TEAC), de transferir un electrón (ensayo FRAP), de reducir a un generador de radicales libres que provoca una disminución de la fluorescencia (ensayo ORAC) y la actividad frente a la peroxidación lipídica (ensayo TBARS). Además, se estudió la actividad antioxidante frente a dos radicales libres específicos, el radical hidroxilo mediante el ensayo ORAC<sub>OH</sub> y el radical óxido nítrico en el ensayo NO.

#### **Ensayo TEAC**

La capacidad antioxidante fue determinada de forma preliminar mediante el ensayo TEAC (del inglés, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Este ensayo determina la capacidad de los compuestos de reducir el catión radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), preparado previamente con persulfato de potasio. Para llevar a cabo este ensayo, se utilizó el trolox, que es un análogo de la vitamina E, como estándar. Se añadieron 200 µL de la mezcla de ABTS en placa multipocillo y 20 µL de muestra. La actividad antioxidante se determinó como una disminución de la absorbancia determinada a 734 nm en el lector de placas (SPECTROstar Omega, BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania). Los resultados fueron expresados en mmol equivalente de Trolox por 100 gramos de extracto seco [128].

### **Ensayo FRAP**

El ensayo FRAP (del inglés, *Ferric Reducing Antioxidant Power*) determina la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir los iones férricos mediante un mecanismo de transferencia de electrón. Para llevar a cabo el ensayo, se preparó una solución 10:1:1 de acetato de sodio 300 mM, tripiridiltriazina (TPTZ) 10 mM y cloruro férrico 20 mM y se añadieron 250  $\mu$ L por pocillo en placa de 96. Esta placa se incubó previamente a 37 °C durante 10 minutos. Tras una medida inicial, se añadieron 40  $\mu$ L de la muestra y se determinó la absorbancia cada 4 minutos a 593 nm en un lector de placas hasta que se estabilizó la señal. Los valores de la capacidad antioxidante de los extractos se determinaron utilizando el sulfato de hierro  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  como estándar y fueron expresados como mmol equivalente de  $\text{FeSO}_4$  por 100 gramos de extracto [129].

### **Ensayo ORAC**

El ensayo ORAC (del inglés, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) determina la capacidad antioxidante de los extractos mediante el uso de fluoresceína y del generador de radicales 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH). Se añadieron 150  $\mu$ L de fluoresceína, 25  $\mu$ L de muestra y 25  $\mu$ L de AAPH por pocillo en placa de 96, obteniéndose una concentración final en los pocillos de 30 mM en el caso de la fluoresceína y de 19 mM de AAPH. Los radicales libres generados por el AAPH disminuyen la fluorescencia de la fluoresceína, generando una señal que decae rápidamente, formando una curva. La actividad antioxidante produce una disminución



de la fluorescencia de una manera considerablemente más lenta, lo que se traduce en un valor mayor de área bajo la curva. Esta señal de fluorescencia se determinó utilizando filtros de excitación de 460 nm y de emisión de 515 nm mediante el lector de fluorescencia Fluostar Galaxy (BMG Labtechnologies GmbH; Offenburg, Alemania). Los valores de ORAC se calcularon utilizando una ecuación de regresión entre la concentración de trolox o de los extractos y el área de caída de la curva de fluorescencia y se expresaron como mmol trolox Eq./100 g extracto [122].

### **Ensayo TBARS**

Se determinó la capacidad antioxidante de los extractos frente a la peroxidación lipídica mediante el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico TBARS (del inglés, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Para ello, se utilizaron vesículas pequeñas unilamelares (SUVs) de fosfolípidos de soja con un 70% de fosfatidilcolina (Lipoid GMBH, Alemania).

Se incubaron 440  $\mu$ L de SUVs a 0,66 mM a 37 °C con el generador de radicales libres AAPH a 10 mM, que induce la peroxidación lipídica, y 20  $\mu$ L de los extractos a 0,5 mg/mL en el caso del extracto de piel de aguacate P85 y de 5 mg/mL en el caso del extracto de rabo de cereza scSFE. Transcurridas 2 horas, se paró la reacción con 100  $\mu$ L de butil hidroxitolueno (BHT) y se congelaron las muestras. La reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo 104  $\mu$ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) 3% (p/v), 208  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (p/v) y 208  $\mu$ L de ácido clorhídrico a 7 mM. Se incubó la mezcla a 95 °C durante 15 minutos, se añadieron 580  $\mu$ L de 1-

butanol, se homogeneizó con la ayuda de un vórtex (Heidolph™ 541-10000-00) y se centrifugó. Por último, se pasaron 150 µL de la fase superior de cada tubo a pocillos de una placa de 96 y se midió la fluorescencia con el lector de placas utilizando un filtro de excitación de 500 nm y de emisión de 530 nm [122]. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición lipídica para la correspondiente concentración de extracto.

### **Ensayo ORAC<sub>OH</sub>**

La capacidad de los extractos de reducir el radical hidroxilo se determinó mediante una variante del ensayo ORAC [130, 131]. En este ensayo, se utilizó la sonda fluorescente β-ficoeritrina (β-PE) a 16,7 nM y el generador del radical hidroxilo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cu<sup>2+</sup> (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 9 mM CuSO<sub>4</sub>). Se utilizó el flavonol quercetina como estándar. La fluorescencia de la sonda se determinó en un lector de placas Fluostar Galaxy cada 2 minutos tras la adición del generador de radicales y el tratamiento utilizando un filtro de excitación de 500 nm y de emisión de 590 nm. El área de la curva descendente de la fluorescencia se utilizó para determinar la actividad antioxidante de los extractos en comparación con la quercetina. El resultado se expresó como mmol equivalente de quercetina por 100 gramos de extracto.

### **Ensayo óxido nítrico NO**

El compuesto nitroprúsido de sodio se descompone en óxido nítrico (NO), y a su vez el radical NO produce nitrato y nitrito en presencia de oxígeno. El reactivo de Griess

permite detectar estos compuestos, por lo que se utilizó esta peculiaridad para determinar la capacidad antioxidante de los extractos frente al óxido nítrico.

Para realizar el ensayo, se disolvió nitroprusido de sodio en un tampón salino y se incubó durante 150 minutos con 200 µg/mL de los extractos. Tras este paso, se realizó una nueva incubación durante 30 minutos con el reactivo de Griess (ácido sulfanílico con dicloruro de naftiletilediamina) y se determinó la absorbancia a 546 nm [132, 133]. El porcentaje de inhibición del radical óxido nítrico se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

$\text{Abs}_{\text{control}}$  es la absorbancia de la reacción sin extracto y  $\text{Abs}_{\text{muestra}}$  es la absorbancia en presencia del extracto (valor corregido).

#### **4.4 Inhibición de enzimas relacionadas con el envejecimiento**

Se determinó la capacidad del extracto scSFE de inhibir cuatro enzimas relacionadas con el envejecimiento, como son la colagenasa, elastasa, hialuronidasa y tirosinasa, así como la glicación, que es un proceso que también se relaciona con el envejecimiento [134]. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición para cada actividad. El extracto scSFE fue disuelto en etanol a una concentración final de 0,02% (p/v), excepto para el ensayo de hialuronidasa. En este ensayo, se utilizó una concentración de 0,001% (p/v) del extracto. Los ensayos se llevaron a cabo en la

empresa Invitrotecnia S.L. (Madrid). A continuación, de manera breve, se explica el fundamento de todos ellos.

### **Inhibición de la colagenasa**

La actividad de inhibición de la colagenasa que produce el extracto de rabo de cereza se determinó mediante la degradación del sustrato *N*-[3-(2-furil) acriloil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA). Se utilizó la epigallocatequina galato (EgCg) como control positivo. Una vez añadido el sustrato a la reacción, se midió la absorbancia a 335 nm en un lector de placas.

### **Inhibición de la elastasa**

La capacidad del extracto de inhibir la elastasa se determinó espectrofotométricamente utilizando *N*-Succ-(Ala) 3-nitroanilida (SANA) como sustrato y el fenilmetanosulfonilo (PMSF) como control positivo. Para determinar la inhibición de la degradación del sustrato se midió la absorbancia a 410 nm en un lector de placas tras la incubación.

### **Inhibición de la hialuronidasa**

La actividad de inhibición de la enzima hialuronidasa para el extracto scSFE se determinó midiendo la señal de absorbancia a 585 nm tras la incubación de *N*-acetilglucosamina con hialuronato de sodio. Se utilizó el compuesto *p*-dimetilaminobenzaldehído como control positivo de inhibición de la hialuronidasa.

### **Inhibición de la tirosinasa**

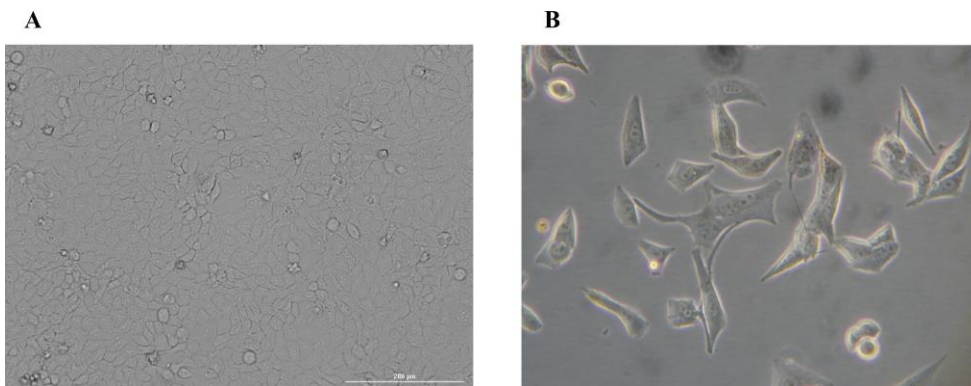
La actividad de inhibición de la tirosinasa se determinó utilizando el compuesto dopacroma como sustrato y el ácido kójico como control positivo de inhibición de la tirosinasa. Para ello, se determinó la absorbancia a 475 nm en un lector de placas una vez estabilizada la señal.

### **Inhibición de la glicación**

Por último, para estudiar la actividad de antiglicación del extracto se utilizó como sustrato la albúmina de suero bovino (del inglés, *Bovine Serum Albumin* o BSA) y como control positivo de inhibición de glicación la aminoguanidina. Se cuantificó la fluorescencia 7 días tras la incubación de BSA con treosa y ácido dietilnetriaminapentaacético en un lector de placas utilizando una longitud de excitación de 370 nm y 440 nm de emisión.

## **4.5 Determinación de la inducción de melanogénesis y fotoprotección de los extractos en modelos celulares**

Se realizaron ensayos celulares con dos modelos *in vitro* de piel. En primer lugar, se utilizó la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT para los ensayos de fotoprotección frente a la radiación UVA y UVB. En segundo lugar, se utilizó la línea celular B16-F10 murina de melanoma para el ensayo de melanogénesis (**Figura 20**).



**Figura 20.** Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT a 4x (A) y línea celular murina de melanoma B16-F10 a 40x (B).

Estas dos líneas celulares son ampliamente utilizadas para la realización de ensayos como modelos de queratinocitos y melanocitos, respectivamente. La línea celular HaCaT fue adquirida de *Cell Lines Service GmbH* (CLS, Eppelheim, Alemania) y la línea celular B16-F10 fue adquirida de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Los queratinocitos fueron cultivados con el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (v/v) y un 1% de penicilina-estreptomicina (0,1 mg/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomicina), mientras que los melanocitos fueron cultivados en un medio con las mismas características y suplementado con piruvato (1% v/v). Estos reactivos fueron adquiridos de Gibco® (Life Technologies Co., Europa). Ambas líneas celulares fueron cultivadas en frascos de 25 o 75 cm<sup>2</sup> en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> (5% v/v) a 37 °C, tripsinizadas cada 3 días y sembradas en placas de 96 pocillos para los diferentes ensayos.

### **Inhibición del estrés oxidativo inducido por la radiación UV y efecto fotoprotector de los extractos**

Para realizar este ensayo se utilizó la sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) para determinar el efecto de inhibición de los extractos frente a la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por la radiación UVA y UVB.

Para ello, se sembraron 14.000 células por pocillo en placas negras de 96 pocillos y se mantuvieron en medio de cultivo durante 24 horas. Pasado este tiempo, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), fueron tratadas con los extractos (100 o 200 µg/mL) disueltos en PBS e inmediatamente irradiadas con UVA (3 o 6 J/m<sup>2</sup>) o UVB (800 o 1200 J/m<sup>2</sup>) utilizando el equipo Bio-Link Crosslinker BLX-365 para la radiación del UVA (**Figura 21**) y BLX-E312 para la UVB (Vilber Lourmat, Francia). Previamente a este ensayo, se determinó la concentración óptima de los extractos que no produjesen toxicidad mediante el ensayo de viabilidad MTT. Este ensayo se basa en la reducción de la sal de compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), de color amarillo y soluble en agua, en cristales de formazán, de color púrpura e insolubles en agua. Esta reacción es catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa y solo ocurre en células viables, por lo que se puede determinar la viabilidad celular mediante la solubilización del formazán con DMSO y midiendo la absorbancia a 570 nm en un lector de placas.



**Figura 21.** Equipo Bio-Link Crosslinker BLX-365.

Tras la irradiación con UVA o UVB, se lavaron las células con PBS y se incubaron con la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA (10 µg/mL en medio de cultivo completo) durante 2 horas para estudiar el estrés oxidativo. La fluorescencia se determinó con filtros de 495 nm de excitación y 520 nm de emisión mediante el lector de placas *Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader* (BioTek, Alemania) (**Figura 22**).



**Figura 22.** Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode.

La inhibición de ROS que produjeron los extractos se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Inhibición de ROS (\%)} = 100 \cdot (C_{UV} - \text{muestra}) / (C_{UV} - 100)$$



Todos los parámetros representan los valores de fluorescencia normalizados con su respectivo tratamiento no irradiado.  $C_{UV}$  es el control irradiado sin tratamiento y la muestra indica el valor de los distintos tratamientos del correspondiente extracto para cada dosis de UVA o UVB.

Además de la actividad antioxidante de los extractos frente a la radiación ultravioleta, se determinó la capacidad de los extractos de proteger frente a la mortalidad que produce la radiación UVB mediante el ensayo MTT. Para ello, se realizó el ensayo de viabilidad MTT a las 24 horas tras la irradiación con UVB (800 y 1200 J/m<sup>2</sup>). La fotoprotección se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Fotoprotección (\%)} = 100 \cdot (C_{UV} - \text{muestra}) / (C_{UV} - 100),$$

donde  $C_{UV}$  es el control irradiado sin tratamiento y la muestra es el tratamiento del extracto a la dosis UVB correspondiente. Todos los valores fueron corregidos previamente con su respectiva condición no irradiada.

### **Efecto inductor de la melanogénesis de los extractos de piel de aguacate**

Se estudió si los extractos presentaban la capacidad de inducir la melanogénesis. Para ello, se utilizó la línea celular murina de melanoma B16-F10 a una densidad de siembra de 6.000 células por pocillo en placa de 96. Pasadas 48 horas, las células se trataron con los diferentes extractos con un rango de concentración de 10-125 µg/mL. Además, como control positivo de inducción de melanogénesis se utilizó el compuesto 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) a 100 µM. Estas concentraciones fueron elegidas

mediante un ensayo previo para determinar la máxima concentración de los extractos que no producía toxicidad. Transcurridas 72 horas de tratamiento, se midió la absorbancia a 410 nm en un lector de placas. Paralelamente, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, con el fin de comprobar la inocuidad de los diferentes tratamientos.

## 5. Análisis estadístico

Los valores fueron representados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de 4-6 determinaciones, en función del ensayo, todos ellos hechos por triplicado. Se realizó el análisis de varianza *one-way* ANOVA y se compararon las distintas condiciones utilizando el post-test de Tukey con el programa GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Se consideró que las diferencias fueron estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ . La significancia estadística mostrada en las distintas figuras y tablas se corresponde con los siguientes símbolos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [51, 125].

**CAPÍTULO 1 – Caracterización y determinación de la  
actividad de tres extractos de rabo de cereza**

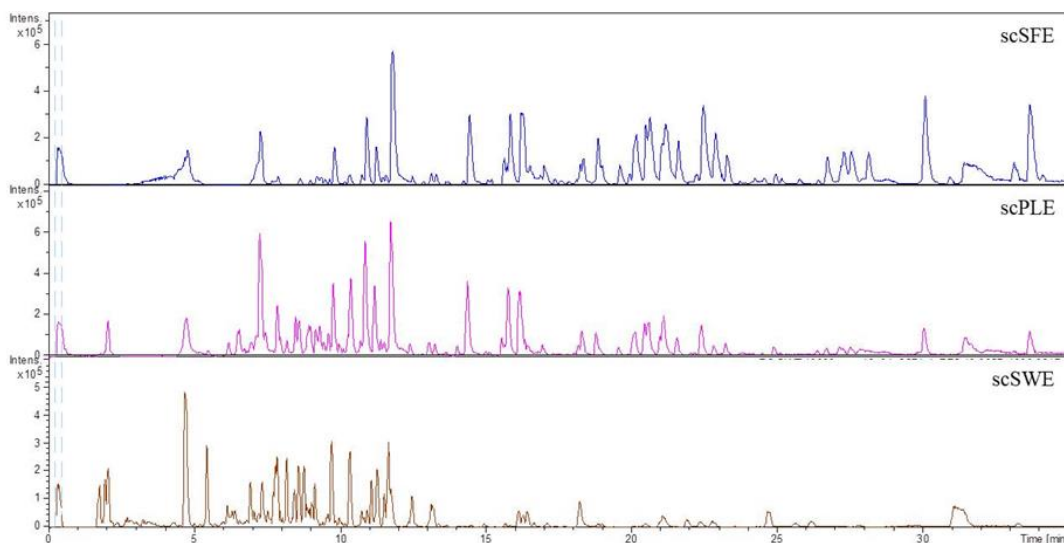


## **RESULTADOS**



## 1. Caracterización de la composición de los extractos de rabo de cereza

La composición de los tres extractos de rabo de cereza, scPLE, scSFE y scSWE fue caracterizada mediante análisis por HPLC-ESI-QTOF-MS. Para realizar este análisis, los extractos secos fueron reconstituidos en el correspondiente disolvente hasta una concentración de 1 g/L tal y como se detalla en el apartado de Metodología. A continuación, se muestra el perfil cromatográfico para cada extracto (**Figura 23**).



**Figura 23.** Cromatograma de pico base de los extractos de rabo de cereza obtenidos por los métodos de extracción SFE (extracto scSFE), PLE (extracto scPLE) y SWE (extracto scSWE).

Los compuestos fueron identificados con base en la información aportada por el programa (masas precisas, distribuciones isotópicas, espectros MS y fórmulas moleculares) junto con el tiempo de retención ( $t_R$ ) y comparados con los estándares disponibles o datos previamente reportados en la bibliografía. Se identificaron hasta 57

compuestos de 4 familias diferentes: ácidos orgánicos, fenólicos y derivados (8 compuestos); flavonoides y derivados (36 compuestos); derivados de ácidos grasos (9 compuestos) y terpenos (4 compuestos). 18 de estos compuestos fueron identificados por primera vez en esta matriz. Los resultados de la identificación se encuentran resumidos en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Datos analíticos de los extractos de rabo de cereza obtenidos mediante análisis por HPLC-ESI-QTOF-MS. Se indican los compuestos identificados en base a los datos obtenidos, así como el extracto en el que se encontraron. El error se muestra en valor absoluto.

Pico	t <sub>R</sub> (min)	m/z experimental	m/z calculado	(M-H) <sup>-</sup>	Error (ppm)	Compuestos	Extractos
1	1,91	195,0499	195,0510	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	5,7	Ácido D-glucónico	scSWE
2	1,99	191,0552	191,0561	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	5,0	Ácido quínico	scSWE
3	5,42	315,0702	315,0722	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub>	6,3	Ácido protocatecuico hexósido	scSWE
4	6,52	577,1381	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	5,0	Proantocianidina B2 isómero 1	scSFE
5	6,81	341,0856	341,0878	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	6,6	Ácido cafeico hexósido	scSFE, scSWE
6	7,23	289,0732	289,0718	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	5,1	(Epi)catequina isómero 1	scSFE, scPLE, scSWE
7	7,31	401,1446	401,1453	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>	1,7	Benzil β-primeverósido	scSWE
8	7,40	137,0243	137,0244	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	0,6	Ácido salicílico	scSWE
9	7,43	577,1381	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	5,1	Proantocianidina B2 isómero 2	scSFE
10	7,54	771,1977	771,1989	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>21</sub>	1,6	Quercetina-rutinósido-glucósido	scSWE
11	7,60	521,2002	521,2028	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> O <sub>11</sub>	5,1	Dihidروهيدروconiferil alcohol glucopiranósido	scSWE
12	7,64	325,0930	325,0929	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	0,3	Ácido p-cumárico O-hexósido	scSFE, scPLE
13	7,74	449,1094	449,1089	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	1,1	Eriodictiol glucósido isómero 1	scSWE
14	7,81	165,0557	165,0557	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	0,4	Ácido melilótico	scSWE
15	7,83	289,0735	289,0718	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	5,9	(Epi)catequina isómero 2	scSFE, scPLE
16	7,88	449,1094	449,1089	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	1,1	Eriodictiol glucósido isómero 2	scSWE
17	8,16	195,0664	195,0663	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	0,8	Ácido dihydroferúlico	scSWE



18	8,45	609,1482	609,1461	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	2,1	Rutina	scSFE, scSWE
19	8,58	465,1073	465,1038	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	3,4	Epicatequina- <i>O</i> - glucurónido	scSFE, scPLE, scSWE
20	8,85	463,0903	463,0882	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	2,1	Quercetina-glucósido	scPLE, scSWE
21	8,91	431,1011	431,0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	6,2	Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 1	scSFE, scPLE, scSWE
22	8,95	593,1534	593,1512	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	3,7	Kaempferol- <i>O</i> -rutinósido	scSFE, scPLE, scSWE
23	9,13	477,1076	477,1038	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	7,9	Isorhamnetina-glucósido	scSFE, scPLE
24	9,15	431,1007	431,0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	5,3	Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 2	scSFE, scPLE
25	9,28	431,1004	431,0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	4,6	Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 3	scSFE, scPLE, scSWE
26	9,42	447,0955	447,0933	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	4,9	Kaempferol- <i>O</i> -glucósido	scSFE, scPLE, scSWE
27	9,58	431,0995	431,0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	2,7	Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 4	scSFE, scPLE
28	9,75	433,1158	433,1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	4,1	Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 1	scSFE, scPLE, scSWE
29	10,25	433,1123	433,1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	4,0	Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 2	scSFE, scPLE
30	10,35	417,1182	417,1191	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	2,2	Liquiritina	scSWE
31	10,69	433,1148	433,1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	1,7	Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 3	scSFE, scPLE
32	10,74	447,1295	447,1297	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	0,3	Sakuranina	scSWE
33	10,84	415,1064	415,1035	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	6,2	Crisina- <i>O</i> -glucósido	scSFE, scPLE
34	10,94	447,1290	447,1297	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	1,6	Sakuranetina glucopiranósido	scSWE
35	11,07	417,1204	417,1191	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	3,1	Sakuranetina xilopiranósido	scSWE
36	11,17	433,1176	433,1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	8,2	Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 4	scSFE, scPLE
37	11,27	417,1196	417,1191	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	1,2	Prupersina B	scSWE
38	11,62	447,1307	447,1297	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	2,4	Dihidrowogonina glucósido	scSWE
39	12,39	327,2175	327,2177	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub>	0,6	Ácido trihidroxi- octadecadienoico	scSFE, scPLE, scSWE
40	12,78	433,1161	433,1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	4,9	Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 5	scSFE, scPLE
41	13,04	329,2346	329,2333	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	3,8	Ácido trihidroxi- octadecenoico	scSFE, scPLE, scSWE
42	13,23	271,0607	271,0612	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	1,7	Naringenina isómero 1	scSFE, scPLE, scSWE

43	13,53	271,0600	271,0612	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	4,2	Naringenina isómero 2	scSFE, scPLE
44	14,35	517,3187	517,3171	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>7</sub>	3,2	Ácido jaligónico	scSFE, scPLE
45	15,74	501,3250	501,3222	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub>	5,7	Ácido hidroxiceanótico isómero 1	scSFE, scPLE
46	16,14	253,0503	253,0506	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	1,4	Crisina	scSFE, scPLE scSWE
47	16,31	285,0775	285,0768	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	2,3	Metilnaringenina	scSFE, scPLE, scSWE
48	16,44	255,0644	255,0663	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	7,3	Pinocembrina	scSFE, scPLE, scSWE
49	16,77	501,3238	501,3222	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub>	3,2	Ácido hidroxiceanótico isómero 2	scSFE, scPLE
50	19,53	293,2122	293,2122	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	0,0	Ácido hidroxioctadecatrienoico isómero 1	scSFE, scPLE
51	19,87	293,2104	293,2122	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	6,1	Ácido hidroxioctadecatrienoico isómero 2	scSFE, scPLE
52	21,52	295,2291	295,2279	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	4,2	Ácido hidroxioctadecadienoico	scSFE, scPLE
53	23,21	293,2111	293,2122	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	3,7	Ácido hidroxioctadecatrienoico isómero 3	scSFE, scPLE
54	30,02	277,2182	277,2173	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	3,4	Ácido linolénico	scSFE, scPLE
55	31,41	455,3528	455,3531	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	0,7	Ácido ursólico	scSWE
56	33,64	279,2327	279,2330	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	1,1	Ácido linoleico	scSFE, scPLE
57	34,06	299,2590	299,2592	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>3</sub>	0,4	Ácido hidroxioctadecanoico	scSFE, scPLE

En la **Tabla 3** se muestran los resultados del análisis semicuantitativo de la composición basado en el área relativa de cada pico identificado presente en cada extracto, agrupados en función de la familia a la que pertenecen.

El extracto scPLE presentó una mayor concentración de la mayoría de compuestos de las familias de los flavonoides y terpenos respecto a los extractos scSFE y scSWE. En este extracto scPLE, el compuesto mayoritario detectado semicuantitativamente fue la (epi)catequina isómero 1, con un área relativa de 573, seguido de crisina-*O*-glucósido, con un área de pico de 432, perteneciendo ambos a la familia de flavonoides y

derivados. Por otro lado, el ácido jaligónico, con un área de 333, fue el compuesto más abundante de la familia de los terpenos (**Figura 24**).

**Tabla 3.** Áreas relativas de los picos de los compuestos identificados en los extractos de rabo de cereza, expresados como la media  $\pm$  SD en unidades arbitrarias. ND indica compuesto no detectado. Se resalta en negrita el extracto que presenta la concentración más alta para cada compuesto.

Compuestos	Área del pico x E+4		
	scPLE	scSFE	scSWE
<b>Ácidos orgánicos, ácidos fenólicos y derivados</b>			
Ácido D-glucónico	ND	ND	<b>22,8 <math>\pm</math> 0,9</b>
Ácido quínico	ND	ND	<b>32,0 <math>\pm</math> 2,0</b>
Ácido cafeico hexósido	<b>5,0 <math>\pm</math> 0,3</b>	ND	2,2 $\pm$ 0,2
Ácido $\rho$ -cumárico <i>O</i> -hexósido	<b>12,0 <math>\pm</math> 2,0</b>	4,0 $\pm$ 0,2	ND
Ácido protocatecuico hexósido	ND	ND	<b>17,2 <math>\pm</math> 0,2</b>
Ácido salicílico	ND	ND	<b>9,9 <math>\pm</math> 0,5</b>
Ácido melilótico	ND	ND	<b>16,6 <math>\pm</math> 0,7</b>
Ácido dihidroferúlico	ND	ND	<b>22,0 <math>\pm</math> 2,0</b>
<b>Flavonoides y derivados</b>			
(Epi)catequina–(epi)catequina (proantocianidina B2) isómero 1	<b>129,0 <math>\pm</math> 8,0</b>	ND	ND
(Epi)catequina isómero 1	<b>573,0 <math>\pm</math> 14,0</b>	282,0 $\pm$ 23,0	5,5 $\pm$ 0,3
(Epi)catequina–(epi)catequina (proantocianidina B2) isómero 2	<b>112,0 <math>\pm</math> 9,0</b>	ND	ND
(Epi)catequina isómero 2	<b>214,0 <math>\pm</math> 44,0</b>	44,0 $\pm$ 4,0	ND
Rutina	<b>121,0 <math>\pm</math> 3,0</b>	ND	13,4 $\pm$ 0,4
Epicatequina- <i>O</i> -glucurónido	<b>113,0 <math>\pm</math> 1,0</b>	20,0 $\pm$ 0,5	25,0 $\pm$ 1,0
Quercetina-glucósido	<b>67,0 <math>\pm</math> 0,6</b>	ND	11,0 $\pm$ 1,0
Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 1	<b>89,0 <math>\pm</math> 0,1</b>	12,0 $\pm$ 0,5	27,8 $\pm$ 0,9
Kaempferol- <i>O</i> -rutinósido	<b>91,0 <math>\pm</math> 4,0</b>	4,0 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,5
Isorhamnetina-glucósido	<b>15,0 <math>\pm</math> 0,2</b>	3,0 $\pm$ 0,3	ND
Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 2	<b>65,0 <math>\pm</math> 4,0</b>	16,0 $\pm$ 1,0	ND
Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 3	<b>102,0 <math>\pm</math> 0,8</b>	24,0 $\pm$ 1,0	8,4 $\pm$ 0,3
Kaempferol- <i>O</i> -glucósido	<b>41,0 <math>\pm</math> 2,0</b>	8,0 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,6

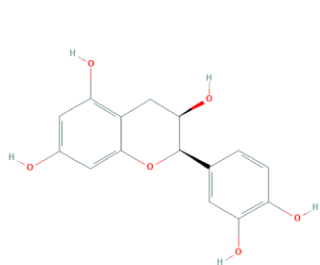
Genisteína- <i>O</i> -glucósido isómero 4	<b>82,0 ± 0,0</b>	17,0 ± 1,0	ND
Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 1	<b>94,0 ± 0,2</b>	34,0 ± 1,0	38,0 ± 1,0
Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 2	<b>89,0 ± 0,4</b>	40,0 ± 1,0	ND
Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 3	<b>57,0 ± 1,0</b>	34,0 ± 4,0	ND
Crisina- <i>O</i> -glucósido	<b>432,0 ± 14,0</b>	180,0 ± 1,0	ND
Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 4	<b>91,0 ± 0,1</b>	49,0 ± 5,0	ND
Naringenina- <i>O</i> -glucósido isómero 5	6,0 ± 0,0	<b>10,0 ± 0,5</b>	ND
Naringenina isómero 1	<b>14,0 ± 1,0</b>	13,0 ± 0,8	8,8 ± 0,2
Naringenina isómero 2	<b>9,0 ± 0,2</b>	5,0 ± 0,4	ND
Crisina	143,0 ± 12,0	<b>143,0 ± 3,0</b>	3,8 ± 0,8
Metilnaringenina	39,0 ± 2,0	<b>42,0 ± 1,0</b>	3,0 ± 0,3
Benzil β-primeverósido	ND	ND	<b>24,6 ± 0,4</b>
Quercetina-rutinósido-glucósido	ND	ND	<b>5,9 ± 0,6</b>
Dihidrodihidroiconiferil alcohol glucopiranosido	ND	ND	<b>4,6 ± 0,3</b>
Eriodictiol-glucósido isómero 1	ND	ND	<b>14,4 ± 0,6</b>
Eriodictiol-glucósido isómero 2	ND	ND	<b>36,0 ± 1,0</b>
Liquiritina	ND	ND	<b>24,0 ± 1,0</b>
Sakuranina	ND	ND	<b>4,3 ± 0,3</b>
Sakuranetina-glucopiranosido	ND	ND	<b>4,9 ± 0,3</b>
Sakuranina-xilopiranosido	ND	ND	<b>18,2 ± 0,2</b>
Prupersina B	ND	ND	<b>22,3 ± 0,4</b>
Dihidrowogonín glucósido	ND	ND	<b>35,0 ± 2,0</b>
Pinocebrín	ND	ND	<b>5,3 ± 0,1</b>
<b>Derivados de ácidos grasos</b>			
Ácido trihidroxi-octadecadienoico	<b>42,0 ± 6,0</b>	29,0 ± 2,0	11,6 ± 0,6
Ácido trihidroxi-octadecenoico	<b>48,0 ± 2,0</b>	40,0 ± 2,0	7,4 ± 0,2
Ácido hidroxioctadecatrienoico isómero 1	19,0 ± 0,3	<b>59,0 ± 0,2</b>	ND
Ácido hidroxioctadecatrienoico isómero 2	9,0 ± 0,5	<b>40,0 ± 0,8</b>	ND
Ácido hidroxioctadecadienoico	76,0 ± 2,0	<b>210,0 ± 12,0</b>	ND
Ácido hidroxioctadecatrienoico isómero 3	57,0 ± 4,0	<b>121,0 ± 5,0</b>	ND
Ácido linolénico	129,0 ± 15,0	<b>407,0 ± 39,0</b>	ND
Ácido linoleico	129,0 ± 2,0	<b>448,0 ± 39,0</b>	ND
Ácido hidroxioctadecanoico	13,0 ± 0,3	<b>49,0 ± 3,0</b>	ND

Terpenos			
Ácido jaligónico	<b>333,0 ± 2,0</b>	297,0 ± 10,0	ND
Ácido ursólico	ND	ND	<b>58,0 ± 11,0</b>
Ácido hidroxiceanótico isómero 1	<b>279,0 ± 7,0</b>	273,0 ± 6,0	ND
Ácido hidroxiceanótico isómero 2	54,0 ± 3,0	<b>78,0 ± 6,0</b>	ND

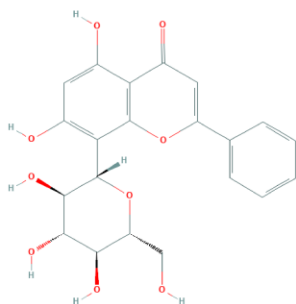
En el extracto scSFE se obtuvieron principalmente los compuestos pertenecientes a derivados de ácidos grasos. Los compuestos mayoritarios determinados semicuantitativamente fueron el ácido linoleico y ácido linolénico, con un área de 448 y 407, respectivamente. Además, los polifenoles mayoritarios en este extracto fueron la crisina y la naringenina, con sus respectivos derivados, así como algunos compuestos de la familia de las catequinas (**Figura 24**).

En el extracto scSWE se obtuvieron en mayor concentración los compuestos pertenecientes a los ácidos orgánicos, fenólicos y derivados, presentando un porcentaje de estos compuestos mayor que en los otros extractos. De la misma forma, se identificaron 12 flavonoides y derivados que no se encontraron en los otros dos extractos. El compuesto mayoritario semicuantitativamente obtenido en este extracto fue el terpeno ácido ursólico, con un área de 58, seguido del flavonoide naringenina-*O*-glucósido isómero 1, con un área de pico de 38 (**Figura 24**).

**Extracto scPLE**

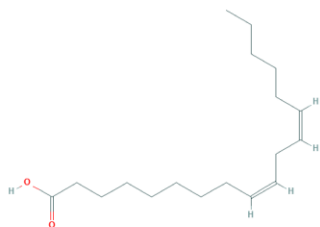


(-)-Epicatequina

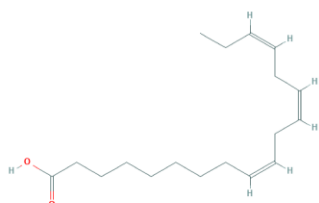


Crisina 8-C-glucósido

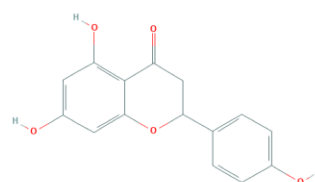
**Extracto scSFE**



Ácido linoleico

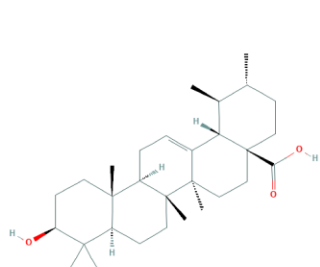


Ácido linolénico

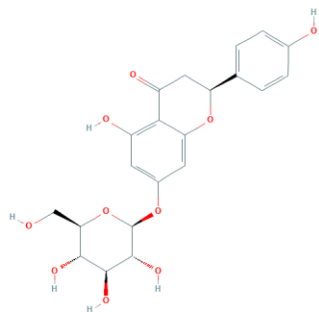


Naringenina

**Extracto scSWE**



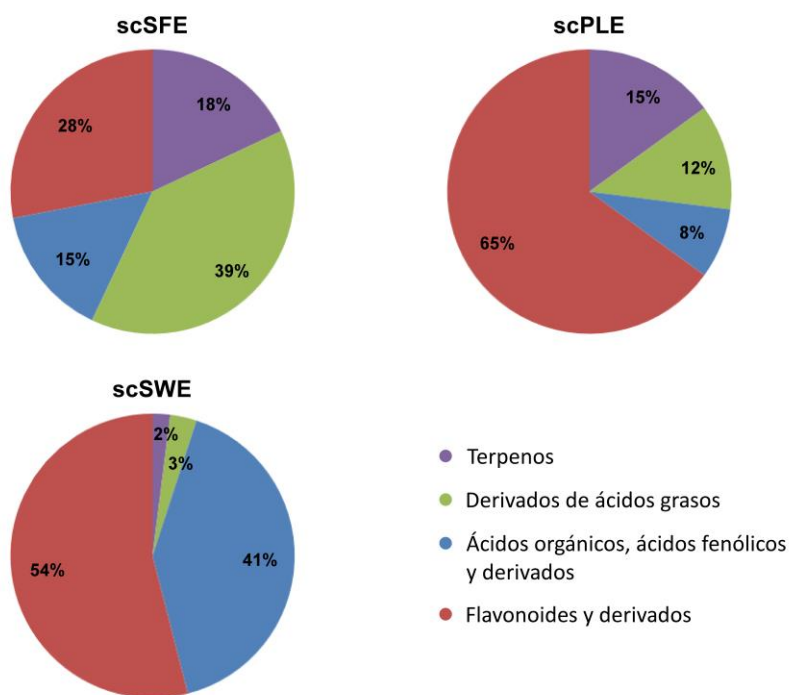
Ácido ursólico



Naringenina-7-O-glucósido o prunina

**Figura 24.** Algunos de los compuestos mayoritarios semicuantitativamente determinados en los 3 extractos de rabo de cereza scSFE, scPLE y scSWE. La representación de los compuestos fue obtenida de PubChem.

En la **Figura 25** se puede observar una comparación semicuantitativa entre las diferentes técnicas de extracción, calculada como la suma de las áreas de los compuestos que hay presentes en cada extracto en función de la familia a la que pertenecen. Se agruparon en 4 familias: terpenos; derivados de ácidos grasos; ácidos orgánicos, fenólicos y derivados y, por último, flavonoides.



**Figura 25.** Datos semicuantitativos sobre las diferentes familias de compuestos extraídos mediante las técnicas SFE (scSFE), PLE (scPLE) y SWE (scSWE).

Del análisis de la **Figura 25** se puede extraer que, en general, los derivados de ácidos grasos y los terpenos se obtuvieron en una mayor concentración mediante la

técnica de extracción SFE, obteniéndose un 39% y un 18% respectivamente de estos compuestos en el extracto scSFE.

Los flavonoides se obtuvieron en mayor concentración en el extracto scPLE, mostrando un 65%, seguido del 54% del extracto scSWE y del 28% del extracto scSFE.

Por último, mediante el método de extracción SWE se obtuvo la mayor concentración de ácidos orgánicos, ácidos fenólicos y derivados, con un 41% en el extracto scSWE respecto al 15 y 8% de los extractos scSFE y scPLE.

## **2. Determinación de la actividad biológica de los extractos de rabo de cereza**

Después de realizar la caracterización de los extractos, se llevó a cabo el estudio de las actividades relacionadas con la industria cosmética para determinar qué extracto presentaba las características óptimas como posible principio activo para un producto dermocosmético. Para ello, se realizó un cribado en dos etapas para seleccionar el candidato final. Este cribado fue realizado teniendo en cuenta las actividades biológicas más relevantes mediante diversos ensayos bioquímicos y celulares que incluyeron la determinación del contenido fenólico, diferentes ensayos de actividad antioxidante, de inhibición de enzimas relacionadas con el envejecimiento y de fotoprotección frente a la radiación ultravioleta.



## 2.1 Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de los extractos de rabo de cereza

El primer ensayo consistió en determinar el contenido fenólico total de los tres extractos. Un mayor contenido fenólico se suele relacionar con una mayor actividad biológica de los extractos naturales [135, 136]. El contenido fenólico fue determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. Además, se determinó la actividad antioxidante de los tres extractos mediante el ensayo TEAC, tal y como se describe en el apartado de Metodología. Los resultados de estos dos ensayos, que completan la primera etapa del cribado, se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Contenido fenólico de los extractos determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y capacidad antioxidante determinada mediante el ensayo TEAC, para los extractos scSFE, scPLE y scSWE. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Además, se resalta en negrita el extracto con la mayor actividad para cada ensayo.

Extracto	Folin % GAE (v/v)	TEAC mmol trolox Eq./100 g extracto
scSFE	15,26 $\pm$ 2,94	<b>240,61 <math>\pm</math> 11,74</b>
scPLE	<b>18,81 <math>\pm</math> 2,36</b>	220,53 $\pm$ 13,57
scSWE	5,49 $\pm$ 1,16	70,38 $\pm$ 3,89

El mayor contenido fenólico se obtuvo en los extractos scPLE y scSFE (18,81 y 15,26% GAE, respectivamente), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores ( $p > 0,05$ ). Además, el extracto scSFE mostró la mayor actividad antioxidante en el ensayo TEAC, seguido del extracto scPLE (240,61 y 220,53 mmol trolox Eq./100 g de extracto, respectivamente). Por otra parte, el extracto scSWE

presentó el menor contenido polifenólico y actividad antioxidante, mostrando unos valores significativamente más bajos ( $p < 0,001$  respecto al extracto scSFE y  $p < 0,0001$  respecto a scPLE). En base a estos resultados, y tras comprobar que los 3 extractos mostraron un comportamiento similar en ambos ensayos, se descartó por sus resultados más bajos al extracto scSWE para los siguientes experimentos, completando así la primera etapa del cribado.

Una vez determinada la bioactividad de los extractos de forma inicial, se realizaron además dos ensayos complementarios para determinar la capacidad antioxidante de los extractos scSFE y scPLE mediante los ensayos FRAP y ORAC. El ensayo FRAP determina la capacidad de reducir el hierro (Fe III), mientras que el ensayo ORAC determina la actividad antioxidante asociada con rompedores de cadenas, lo cual se relaciona directamente con la actividad frente a los radicales peroxilo. Esta actividad es más semejante a la función biológica de los antioxidantes [137]. Los resultados para ambos ensayos se pueden observar en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Capacidad antioxidante de los extractos scSFE y scPLE mediante dos métodos diferentes: el FRAP determina la actividad comparado con el sulfato de hierro y el ORAC respecto al trolox. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD. Se resalta en negrita el extracto con la mayor actividad para cada ensayo.

Extracto	FRAP	ORAC
	mmol FeSO <sub>4</sub> Eq./100 g extracto	mmol trolox Eq./100 g extracto
scSFE	64,83 $\pm$ 6,32	<b>107,77 <math>\pm</math> 5,76</b>
scPLE	<b>203,94 <math>\pm</math> 8,37</b>	64,15 $\pm$ 1,04

Ambos extractos mostraron una significativa actividad antioxidante en los ensayos FRAP y ORAC, con valores más altos que en otros extractos previamente caracterizados en el grupo de investigación [122]. El extracto scSFE mostró la mayor actividad en el ensayo ORAC y el extracto scPLE en el ensayo FRAP. Como se ha comentado previamente, el ensayo ORAC se relaciona con los radicales peroxilo, lo cual indica que el extracto scSFE, por haber presentado mejores resultados en este ensayo, es más interesante desde un punto de vista cosmético, ya que los radicales peroxilo se encuentran frecuentemente en productos cosméticos debido a la inclusión de ingredientes oleosos en estas formulaciones. Además, la técnica de extracción SFE es más interesante desde un punto de vista industrial, ya que está preparada para la obtención de cantidades industriales, a diferencia de la extracción mediante PLE. Por estas razones, se seleccionó el extracto scSFE para continuar con los siguientes ensayos, finalizando así el cribado de los extractos y empezando la última fase del estudio.

En esta última fase, se profundizó aún más en la actividad antioxidante del extracto scSFE mediante tres ensayos adicionales: se determinó la capacidad del extracto de reducir la peroxidación lipídica, de actuar contra el radical hidroxilo y contra el radical óxido nítrico. En esta etapa, fue necesario optimizar los protocolos de estos dos últimos ensayos a partir de la bibliografía existente, ya que no se disponía de los mismos en el laboratorio. Los resultados para los tres ensayos se pueden observar en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Capacidad antioxidante del extracto scSFE determinada mediante 3 ensayos distintos. Los resultados muestran la actividad contra la peroxidación lipídica mediante el ensayo TBARS (% inhibición de la peroxidación lipídica de 5 mg/mL del extracto), eliminación del radical hidroxilo determinada mediante el ensayo ORAC<sub>OH</sub> (en mmol quercetina Eq./100 g extracto) y la capacidad del extracto (200 µg/mL) de eliminar el radical óxido nítrico (% Eliminación). Los resultados están expresados como la media ± SD.

Extracto	TBARS	ORAC <sub>OH</sub>	% Eliminación NO
scSFE	45,13 ± 10,84	18,91 ± 0,08	29,37 ± 0,01

El extracto scSFE mostró una significativa capacidad antioxidante en los tres ensayos realizados. En el ensayo TBARS se obtuvo una inhibición de la peroxidación lipídica de un 45,13% utilizando 5 mg/mL del extracto. En el ensayo ORAC<sub>OH</sub> se observó una eliminación del radical hidroxilo equivalente a 18,91 mmol quercetina Eq./100 g de extracto. Por último, 200 µg/mL del extracto eliminaron un 29,37% del radical óxido nítrico. Estos resultados indican que el extracto scSFE es un candidato para ser considerado como un posible principio activo contra el estrés oxidativo, ya que ha demostrado actividad antioxidante en ensayos que determinan diferentes mecanismos, así como frente a la peroxidación lipídica y radicales libres.

## **2.2 Inhibición de algunos procesos enzimáticos relacionados con el envejecimiento de la piel por el extracto scSFE**

Además de la actividad antioxidante, se determinó la actividad del extracto scSFE sobre cuatro enzimas (colagenasa, elastasa, hialuronidasa y tirosinasa), así como sobre la formación de productos de glicación, que se relacionan con la salud y apariencia de la piel. La inhibición de estas cuatro enzimas y de la formación de AGEs se relaciona

con la prevención de la degradación de la matriz extracelular, con el mantenimiento de la piel y el antienvjecimiento. Los resultados del ensayo de inhibición de estos procesos se pueden observar en la **Tabla 7**, donde se muestra el porcentaje de inhibición para cada enzima o la glicación, utilizando los respectivos controles positivos como 100%.

**Tabla 7.** Determinación del porcentaje de inhibición (%)  $\pm$  SD de la colagenasa, tirosinasa, elastasa, hialuronidasa y glicación por el extracto scSFE. \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican una actividad estadísticamente significativa comparado con el control no tratado; ns (no-significativo).

Extracto	Porcentaje de inhibición (%)				
	Colagenasa	Tirosinasa	Elastasa	Hialuronidasa	Glicación
scSFE	-11,76 $\pm$ 2,71	40,47 $\pm$ 19,35	164,11 $\pm$ 27,33	90,80 $\pm$ 5,93	51,76 $\pm$ 7,06
	ns	ns	**	****	****

El extracto scSFE no presentó inhibición de la colagenasa (valor negativo), lo que significa que la actividad obtenida al tratar con el extracto fue menor que la actividad obtenida en el control negativo del ensayo. Sin embargo, este valor no tiene significancia estadística, por lo que el efecto del extracto no es relevante en este caso.

En cuanto a la tirosinasa, la inhibición se relaciona con una disminución de la producción de melanina. El extracto inhibió un 40% respecto al control negativo, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que no se considera relevante esta actividad. Por lo tanto, el extracto scSFE no presenta una actividad significativa respecto a la colagenasa ni a la tirosinasa.

Por otro lado, el extracto mostró un porcentaje elevado de inhibición de la elastasa, de un 164%, por lo que su inhibición fue superior incluso al control positivo PMSF utilizado y presentando significancia estadística (\*\*,  $p < 0,01$ ).

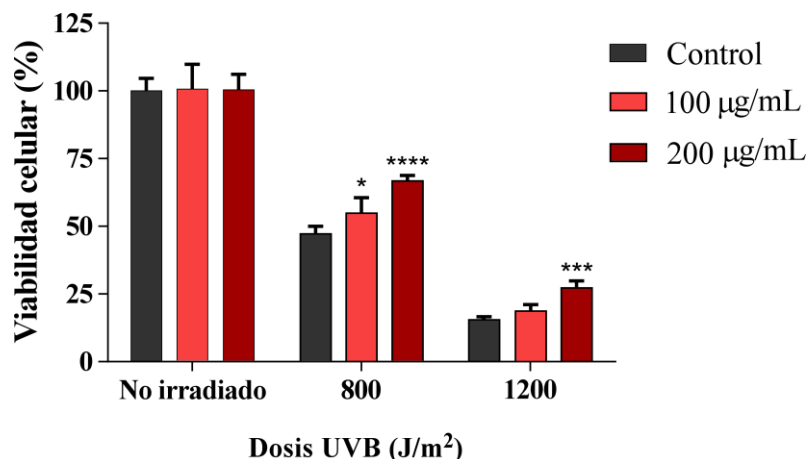
En el caso de la enzima hialuronidasa, el extracto también presentó una alta inhibición, un 90,80%, alcanzando una inhibición similar a la del control positivo *p*-dimetilaminobenzaldehído y con una alta significancia estadística (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

Por último, el extracto mostró una inhibición significativa estadísticamente de la formación de AGEs (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ), de un 51% respecto al control no tratado. Esto se corresponde con lo esperado dada la actividad antioxidante del extracto, ya que la glicación de proteínas se incrementa con el estrés oxidativo.

Estos resultados muestran que el extracto presenta capacidad para inhibir a la elastasa, hialuronidasa y el proceso de glicación, por lo que podría ser un principio activo candidato a ser utilizado en un producto dermocosmético antienvjecimiento.

### **2.3 Efecto protector del extracto scSFE frente a la radiación UVB**

Se estudió el posible efecto protector del extracto scSFE frente a la radiación UVB en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Para ello, se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo MTT a las 24 horas de irradiar las células con 800 o 1200 J/m<sup>2</sup> de UVB, en ausencia o presencia del extracto scSFE a 100 o 200 µg/mL. Se determinó el porcentaje de viabilidad celular respecto al control no irradiado correspondiente a cada una de las dosis de UVB empleadas (**Figura 26**).



**Figura 26.** Efecto en la viabilidad celular del extracto scSFE (100 o 200 µg/mL) después de irradiar con UVB (800 o 1200 J/m<sup>2</sup>). Los valores se corresponden con la media de los datos de 6 réplicas ± SD. \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control irradiado a la correspondiente dosis y en ausencia del extracto. Cada condición tratada está normalizada con su respectivo tratamiento del extracto y no irradiado (100%).

Además, a partir de los datos obtenidos en la **Figura 26**, se calculó el porcentaje de incremento de la viabilidad celular o fotoprotección en comparación con la respectiva condición irradiada sin tratamiento (**Tabla 8**). Estos valores se calcularon tal y como se indica en la sección de Metodología.

**Tabla 8.** Porcentaje de fotoprotección para 100 o 200 µg/mL del extracto scSFE tras la irradiación con 800 o 1200 J/m<sup>2</sup> de UVB.

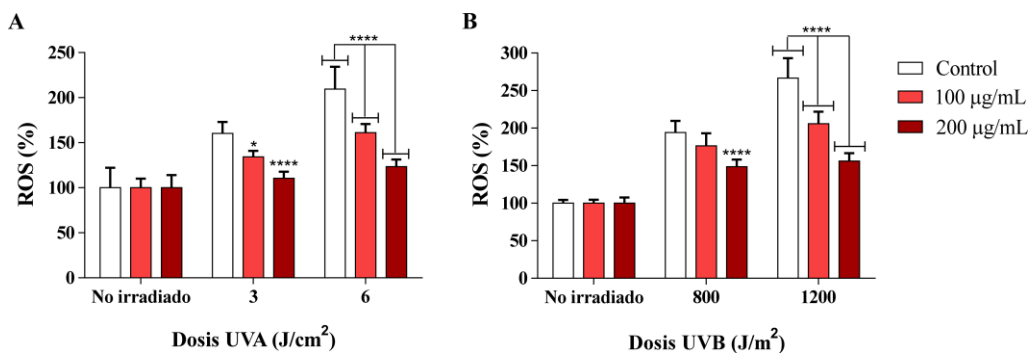
Extracto scSFE Concentración (µg/mL)	Fotoprotección (%)	
	Dosis de UVB	
	800 J/m <sup>2</sup>	1200 J/m <sup>2</sup>
100	14,61	3,51
200	36,53	13,99

El extracto scSFE aumentó la viabilidad de las células a las 24 horas de irradiar con UVB, en comparación con el control irradiado sin tratamiento. A  $800 \text{ J/m}^2$ , el tratamiento de las células a  $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$  del extracto incrementó la viabilidad celular un 14,61%, mientras que para la dosis de  $1200 \text{ J/m}^2$  esta concentración del extracto no tuvo un efecto significativo. Esta protección se incrementó a concentraciones mayores del extracto, observándose un efecto dosis-respuesta. A  $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ , se obtuvo el mayor aumento de la viabilidad celular con la dosis de UVB de  $800 \text{ J/m}^2$ , correspondiente a una protección del 36,53% respecto al control no tratado. Además, se obtuvo un aumento del 13,99% de la viabilidad con esta concentración de extracto tras la irradiación con la dosis de  $1200 \text{ J/m}^2$  de UVB.

#### **2.4 Inhibición de la producción de ROS intracelular por el extracto scSFE inducida por la radiación UVA y UVB**

Por último, se comprobó la capacidad antioxidante del extracto scSFE frente al estrés oxidativo generado por la radiación UVA y UVB. Para ello, se determinaron las especies reactivas de oxígeno intracelulares mediante la sonda fluorescente diclorofluoresceína-diacetato  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  tras la irradiación con UVA y UVB. En la **Figura 27** se puede observar el porcentaje de ROS intracelular tras la irradiación con UVA ( $3$  y  $6 \text{ J/cm}^2$ ) y UVB ( $800$  y  $1200 \text{ J/m}^2$ ), en comparación con el control no irradiado y en ausencia o presencia del extracto scSFE ( $100$  y  $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ).





**Figura 27.** Determinación de la actividad antioxidante del extracto scSFE relacionada con el aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno debido al UVA (A) y UVB (B) en la línea celular HaCaT. Los valores de fluorescencia están normalizados con los controles no irradiados. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SD del porcentaje de ROS (n=6). \* ( $p < 0,05$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas comparado con las células irradiadas a la dosis correspondiente de UVA (3 o 6 J/cm<sup>2</sup>) y UVB (800 o 1200 J/m<sup>2</sup>) en ausencia del extracto scSFE.

Para favorecer la visualización de la reducción del estrés oxidativo, se calculó el porcentaje de inhibición del estrés oxidativo en comparación con el respectivo control irradiado (**Tabla 9**). Estos valores se calcularon tal y como se indica en la Metodología.

**Tabla 9.** Porcentaje de inhibición del estrés oxidativo (%) producido por 100 y 200 µg/mL del extracto scSFE contra la producción de radicales libres inducida por la radiación UVA y UVB. Se utilizaron 3 y 6 J/cm<sup>2</sup> de UVA y 800 y 1200 J/m<sup>2</sup> de UVB.

Extracto scSFE (µg/mL)	Inhibición del estrés oxidativo (%)			
	Dosis UVA		Dosis UVB	
	3 J/cm <sup>2</sup>	6 J/cm <sup>2</sup>	800 J/m <sup>2</sup>	1200 J/m <sup>2</sup>
100	43,38	44,12	18,87	36,51
200	82,42	78,69	48,34	66,33

El extracto scSFE presentó la capacidad de inhibir en gran medida el estrés oxidativo producido por la irradiación con UVA y UVB. El tratamiento con 100 µg/mL del extracto mostró una actividad de inhibición del estrés oxidativo inducido por UVA de aproximadamente un 44% para ambas dosis utilizadas, 3 y 6 J/cm<sup>2</sup>. Además, este tratamiento inhibió el estrés oxidativo inducido por UVB en un 18,87 y 36,51% para las dosis de 800 y 1200 J/m<sup>2</sup>, respectivamente.

Esta actividad del extracto fue incrementada con el tratamiento de 200 µg/mL del extracto scSFE. El extracto inhibió de forma significativa el estrés oxidativo inducido por el UVA, obteniéndose una reducción de aproximadamente un 80% para las dos dosis de UVA. Además, prácticamente se duplicó la inhibición del estrés oxidativo inducido por el UVB respecto al tratamiento de 100 µg/mL, observándose un comportamiento de dosis-respuesta. Se obtuvo una inhibición de 48,34 y 66,33% para 800 y 1200 J/m<sup>2</sup> de UVB, respectivamente, comparado con el correspondiente control irradiado.

Estos resultados, en su conjunto, muestran una interesante actividad fotoprotectora del extracto scSFE frente a la radiación UVA y UVB y presentan un indicio en células de la importante actividad antioxidante que había presentado el extracto en los ensayos anteriores. Por todo ello, el extracto scSFE podría ser considerado como un interesante principio activo para su uso como ingrediente en productos de protección solar, además de productos antienvejecimiento.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



### **1. La actividad antioxidante del extracto scSFE se podría deber a los polifenoles naringenina, catequina y crisina**

Para llevar a cabo el presente estudio se determinó la capacidad antioxidante de tres extractos de rabo de cereza obtenidos mediante tres métodos y se seleccionó el extracto scSFE como potencial candidato para ser utilizado como principio activo por sus mejores resultados. Este extracto mostró una alta capacidad antioxidante, determinada mediante diversos ensayos y frente a distintas dianas, como la peroxidación lipídica o la acción de diferentes radicales libres.

La actividad antioxidante es muy valorada en los principios activos de ingredientes cosméticos, no solo por el efecto beneficioso de la actividad antioxidante en sí mismo, sino porque esta actividad protege al producto cosmético de la oxidación, especialmente la relacionada con sus ingredientes grasos. Los extractos naturales han demostrado su capacidad de reducir el estrés oxidativo, principalmente debido a los polifenoles, que son compuestos antioxidantes ampliamente estudiados [138, 139]. Los flavonoides, un subgrupo de los polifenoles, han mostrado previamente la capacidad de bloquear diferentes radicales, entre los que se encuentran los radicales peroxilo o el anión superóxido [140-142], así como han mostrado la capacidad de inhibir radicales hidroxilo en el ensayo  $ORAC_{OH}$ , realizado en este estudio [131].

El extracto scSFE contiene diferentes familias de compuestos, siendo el grupo de polifenoles uno de los mayoritarios, ya que se incluyen los flavonoides, ácidos fenólicos y derivados. Por este motivo, el efecto antioxidante del extracto scSFE podría deberse

mayoritariamente a estos compuestos, pero también podría deberse a la presencia de otros compuestos, especialmente los terpenos y los ácidos grasos [143, 144].

Los polifenoles principales en este extracto son las catequinas, naringeninas y crisinas, por lo que se relaciona la actividad antioxidante, la inhibición de la peroxidación lipídica y la inhibición de los radicales libres hidroxilo y óxido nítrico del extracto scSFE con estos compuestos, que han mostrado previamente una capacidad antioxidante. La naringenina es una flavanona que se suele encontrar en cítricos y uvas, entre otras frutas. Este polifenol ha mostrado actividad antioxidante mediante la inhibición de la peroxidación lipídica, mediante el incremento de la defensa antioxidante y el bloqueo de radicales libres, entre los que se encuentran el hidroxilo, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico [145, 146]. Además de la naringenina, las catequinas son flavanoles que han mostrado actividad antioxidante determinada mediante diferentes ensayos, entre los que se encuentran el ensayo ABTS y FRAP. Estas moléculas protegen frente a la inducción de radicales peroxilo generados por el AAPH, frente a la peroxidación lipídica y pueden bloquear radicales libres [147, 148]. Por último, la flavona crisina y sus derivados han mostrado la capacidad de reducir la peroxidación lipídica, de regular la homeostasis de los procesos redox y producen un aumento de las enzimas antioxidantes [149, 150].

## **2. La actividad de inhibición de las enzimas cosméticas podría deberse a las catequinas del extracto scSFE**

Se estudió la capacidad del extracto scSFE de inhibir las enzimas tirosinasa, colagenasa, elastasa e hialuronidasa, así como del proceso de glicación. Estas enzimas y procesos se relacionan con el envejecimiento de la piel, y su inhibición conlleva la protección frente a la aparición de arrugas, pérdida de elasticidad y firmeza de la piel, entre otros. El extracto scSFE inhibió la actividad de la elastasa, hialuronidasa y el proceso de glicación de forma significativa, mientras que la inhibición de la tirosinasa no fue estadísticamente significativa y no se halló actividad sobre la colagenasa.

Diversos extractos vegetales han mostrado previamente la capacidad de inhibir la actividad de la tirosinasa, colagenasa, elastasa e hialuronidasa [151-153]. De hecho, una gran variedad de compuestos provenientes de las plantas, pertenecientes a diferentes clases de polifenoles, terpenoides o esteroides, son inhibidores de la colagenasa, elastasa e hialuronidasa. Algunos de los compuestos inhibidores de estas enzimas son las catequinas, el ácido carnósico, el ácido elágico y los ácidos hidroxicinámicos, entre otros [154-157]. Además, algunos de los extractos que contienen estos compuestos inhiben radicales libres y la degradación enzimática o promueven la síntesis de los componentes de la piel, lo cual se relaciona con una mejora de la elasticidad y firmeza de la misma [158, 159].

Los polifenoles presentes en el extracto scSFE podrían ser los principales responsables de la inhibición de estas enzimas relacionadas con la cosmética. La capacidad de inhibición de estas enzimas se asocia con el número de grupos hidroxilo

que presentan los polifenoles, ya que éste se relaciona directamente con la actividad de los compuestos, mientras que las sustituciones o glicosilaciones de los grupos hidroxilo implican una menor actividad de inhibición de estas enzimas [160]. Esta actividad de inhibición que muestran algunos compuestos naturales puede darse mediante diferentes mecanismos, entre los que se incluyen la inhibición enzimática competitiva y no competitiva [161, 162].

Los compuestos catequina y galato de epigallocatequina han mostrado previamente la capacidad de inhibir a la colagenasa y elastasa, mientras que la naringenina inhibe la actividad de la hialuronidasa [162]. Además, la catequina y sus derivados, como los identificados en el extracto scSFE, presentan una alta inhibición de la tirosinasa y de la melanogénesis, lo cual es un método para tratar alteraciones de la pigmentación en la piel [163].

Otro ejemplo de inhibición de estas enzimas es un extracto de *Libidibia ferrea*, cuyos compuestos principales son los polifenoles ácido elálgico, catequina y epicatequina. Este extracto inhibió a las enzimas elastasa, hialuronidasa y tirosinasa, mientras que presentó muy baja actividad frente a la colagenasa, lo cual se corresponde con la actividad mostrada por el extracto scSFE [164].

Todos estos resultados muestran que las catequinas, que representan algunos de los picos mayoritarios obtenidos en el extracto scSFE, podrían ser los principales responsables de la actividad de inhibición de las enzimas relacionadas con el envejecimiento de la piel que ha mostrado este extracto. Sin embargo, serían necesarios



más estudios para identificar a los compuestos responsables de la actividad de inhibición enzimática mostrada, así como estudiar el mecanismo de acción mediante el cual ejercen este efecto.

### **3. El efecto fotoprotector del extracto scSFE podría deberse principalmente a la absorción de la radiación UV y también a su actividad antioxidante**

Por último, se estudió el efecto fotoprotector del extracto scSFE. El extracto redujo la mortalidad celular producida por la radiación UVB, así como inhibió la generación de radicales libres provocada por la irradiación con UVA y UVB. Este efecto fotoprotector podría deberse a diferentes mecanismos. En primer lugar, la capacidad del extracto scSFE de absorber la radiación UV podría ser la responsable del efecto observado, ya que muchos extractos de plantas han demostrado esta habilidad de absorber y bloquear la radiación UV [125, 165-167]. En segundo lugar, la fotoprotección del extracto scSFE podría deberse a la inhibición de radicales libres generados por la radiación UV. De hecho, los compuestos catequina, crisina y naringenina han mostrado previamente un efecto reductor del estrés oxidativo generado por la radiación UV en modelos celulares [147, 168, 169]. Además, los diversos ensayos antioxidantes llevados a cabo en este estudio revelan una alta actividad antioxidante del extracto scSFE, por lo que este mecanismo tendría una gran relevancia en el efecto fotoprotector obtenido. Por último, la fotoprotección podría deberse a otros mecanismos intracelulares, como son la atenuación del daño en el material genético y mecanismos de muerte celular, tal y como han presentado previamente otros extractos de plantas [123, 125, 170-172]. Por otro lado, algunos compuestos del extracto scSFE han

evidenciado diferentes actividades relacionadas con la fotoprotección. En este sentido, la naringenina ha mostrado la habilidad de incrementar la supervivencia de los queratinocitos y de inhibir la apoptosis y los dímeros de pirimidina tras la radiación con UVB [169]. La catequina y sus derivados han manifestado la capacidad de reducir el daño en queratinocitos inducido por el UVB [173, 174] y esta protección de las células de la piel frente a la radiación UVB podría deberse a su actividad antioxidante [175]. Por último, la crisina ha mostrado una fotoprotección mediante la atenuación de la apoptosis y generación de ROS inducidas por el UVB [168, 176].

Por lo tanto, una parte importante de la fotoprotección observada tras el tratamiento con el extracto scSFE podría deberse principalmente a la absorción de la radiación UV (efecto pantalla) y la inhibición de la generación de radicales libres y el estrés oxidativo, así como a una posible actividad de defensa intracelular. Estas distintas actividades se podrían deber a sus compuestos principales, entre los que se incluyen la naringenina, las catequinas y la crisina.

Todas las actividades determinadas en este estudio muestran que el extracto de rabo de cereza seleccionado por los sucesivos cribados, scSFE, es un potencial candidato para ser utilizado como un principio activo en un producto dermocosmético, con un posible enfoque de antienvjecimiento. Para ello, se necesitarían futuros ensayos para establecer el mecanismo de acción del extracto y determinar la actividad del ingrediente en una formulación con el objetivo de ser utilizada en nuevos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

**CAPÍTULO 2 – Cuantificación y análisis de la  
composición y bioactividad de tres extractos de piel y  
tres extractos de semilla de aguacate**

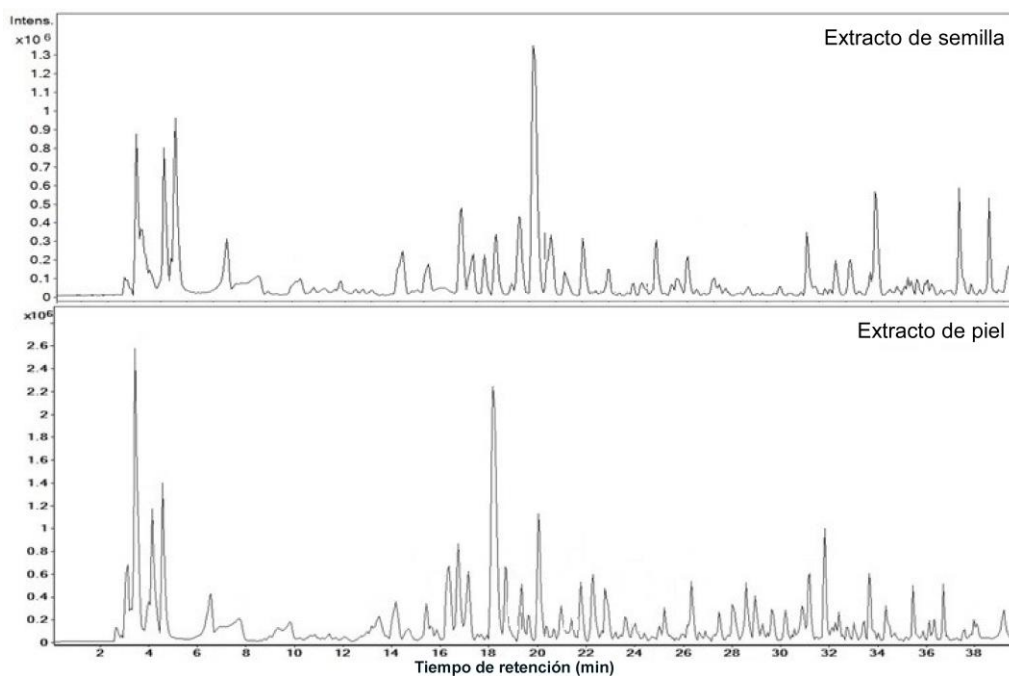


## **RESULTADOS**



### 1. Caracterización de los extractos de piel y semilla de aguacate

Para llevar a cabo la caracterización de los extractos, se identificaron los compuestos presentes en los extractos de piel de aguacate P45, P65 y P85 y de los extractos de semilla de aguacate S45, S65 y S85 mediante análisis por HPLC-ESI-QTOF-MS. Se identificaron 65 compuestos, 34 de estos fueron encontrados en ambas materias primas, piel y semilla, mientras que 19 fueron únicamente encontrados en los extractos de semilla y 12 en los de piel. En la **Figura 28** se puede observar un cromatograma representativo de los picos base para los extractos de semilla y piel de aguacate.



**Figura 28.** Cromatogramas representativos de los extractos de semilla y de piel de aguacate.

Para la identificación se utilizaron los valores de tiempo de retención, espectro de masa y patrón de fragmentación. Además, para cada compuesto se compararon los valores con los estándares disponibles comercialmente o bien se comparó con información disponible en la bibliografía.

Los compuestos identificados pertenecientes a diferentes familias fueron agrupados en diferentes categorías: ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, derivados de alcoholes fenólicos, flavonoides y otros compuestos polares. A su vez, dentro de los flavonoides, se separó en catequinas, taninos condensados y otros flavonoides.

El nombre de los compuestos identificados, así como su tiempo de retención, fórmula molecular, m/z experimental y calculada, el error en ppm y los fragmentos MS/MS (m/z, abundancia relativa) se encuentran resumidos en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Parámetros e identificación de los compuestos obtenidos en los extractos de aguacate. Se indica el compuesto identificado para cada pico, el tiempo de retención ( $t_R$ ) en minutos, los valores de m/z medidos y calculados, la fórmula molecular y el error en valor absoluto. Proc. hace referencia a las procianidinas.

Número Pico	Compuestos	$t_R$ (min)	m/z medida	m/z calculada	Fórmula molecular	Error (ppm)
1	Perseitol	2,87	211,082	211,0823	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	1,6
2	Ácido quínico	2,99	191,056	191,0561	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0,9
3	Ácido cítrico	3,49	191,019	191,0197	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	2,9
4	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	8,05	167,037	167,0350	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	9,9
5	Ácido protocatecuico	8,61	153,019	153,0193	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	17,4
6	Hidroxitirosol glucósido	8,80	315,109	315,1085	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	0,1



7	Pirocatecol	9,64	109,031	109,0295	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	12,4
8	Ácido 3-O-cafeoilquínico	10,77	353,089	353,0878	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	2,3
9	Tirosol glucósido	11,45	299,117	299,1136	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	11,0
10	Penstemida	12,55	443,195	443,1923	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	6,3
11	Proc. dímero B isómero 1	13,17	577,142	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	11,6
12	Tirosol glucosil-pentósido	13,3	431,157	431,1559	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	2,3
13	Ácido 4-hidroxibenzoico	13,37	137,027	137,0244	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	15,6
14	Ácido 3-p-cumaroilquínico	13,70	337,097	337,0929	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	11,9
15	Ácido p-cumárico	13,94	163,041	163,0401	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	8,2
16	Proc. dímero B isómero 2	14,24	577,144	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	15,3
17	Ácido 5-O-cafeoilquínico	14,53	353,089	353,0878	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	2,3
18	Ácido vanílico	15,19	167,034	167,0350	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	9,0
19	Ácido 3-feruloilquínico	15,24	367,104	367,1035	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	0,2
20	(+)-Catequina	15,53	289,074	289,0718	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	6,6
21	Ácido 4-O-cafeoilquínico	15,84	353,090	353,0878	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	5,7
22	Proc. dímero B isómero 3	16,12	577,143	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	13,6
23	Proc. dímero B isómero 4	17,70	577,143	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	13,8
24	Ácido 5-p-cumaroilquínico	18,58	337,097	337,0929	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	11,1
25	Ácido 4-p-cumaroilquínico	19,21	337,102	337,0929	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	8,9
26	(-)-Epicatequina	19,52	289,073	289,0718	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	3,6
27	Vanilina	19,72	151,039	151,0401	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	4,9
28	Proc. trímero A isómero 1	20,43	863,175	863,1829	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	8,8
29	Ácido 4-feruloilquínico	20,51	367,104	367,1035	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	2,4
30	Proc. trímero A isómero 2	20,70	863,177	863,1829	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	7,3
31	Proc. dímero B isómero 5	20,83	577,135	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	3,5

32	Proc. trímero B isómero 1	20,95	865,191	865,1985	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	8,5
33	Quercetina-diglucósido isómero 1	21,73	625,145	625,1410	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	6,3
34	Quercetina-diglucósido isómero 2	21,91	625,143	625,1410	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	3,3
35	Proc. dímero B isómero 6	22,00	577,135	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	4,8
36	Ácido 5-feruloilquínico	22,13	367,101	367,1035	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	6,4
37	Proc. trímero B isómero 2	22,79	865,205	865,1985	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	7,1
38	Proc. trímero A isómero 3	23,13	863,175	863,1829	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	9,5
39	Quercetina- <i>O</i> -arabinosil-glucósido	23,71	595,127	595,1305	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	5,2
40	Rutina	24,23	609,148	609,1461	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	6,4
41	Proc. trímero A isómero 4	24,18	863,176	863,1829	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	7,6
42	Proc. dímero B isómero 7	24,58	577,135	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	4,8
43	Ácido hidroxiabscísico glucósido	24,62	441,181	441,1766	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	10,2
44	Proc. dímero A isómero 1	25,28	575,118	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	2,2
45	Luteolina pentosil-hexósido	26,08	579,138	579,1355	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	1,8
46	Proc. dímero B isómero 8	26,29	577,138	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	4,0
47	Quercetina-3-β-glucósido	26,84	463,089	463,0882	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	1,2
48	Quercetina glucurónido	27,08	477,065	477,0691	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	3,5
49	Proc. dímero A isómero 2	28,22	575,118	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	2,9
50	Proc. dímero A isómero 3	28,28	575,117	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	4,1
51	Multinósido A	28,40	609,148	609,1461	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	1,9
52	Proc. dímero A isómero 4 (A2)	29,42	575,114	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	9,6
53	Quercetina xilosil-ramnósido	30,22	579,138	579,1355	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	0,5
54	(Epi)galocatequina	30,28	305,067	305,0667	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	1,1
55	Proc. dímero A isómero 5	30,85	575,113	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	10,8
56	Proc. dímero A isómero 6	31,09	575,114	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	9,6

57	Kaempferol- <i>O</i> -ramnosil-glucósido	31,40	593,151	593,1512	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	1,8
58	Proc. dímero A isómero 7	32,57	575,115	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	7,3
59	Proc. dímero A isómero 8	34,68	575,116	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	5,8
60	Proc. dímero A isómero 9	35,87	575,117	575,1195	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	3,9
61	Quercetina	37,84	301,036	301,0354	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0,6
62	Kaempferol	38,97	285,042	285,0405	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	6,7
63	(±)-Naringenina	39,08	271,060	271,0553	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	5,4
64	Proc. dímero B isómero 9	39,55	577,135	577,1351	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	4,2
65	Sakuranetina	40,10	285,074	285,0768	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	8,7

Se identificaron dos ácidos orgánicos en los extractos de aguacate, el ácido quínico y el cítrico. También se identificaron un total de 13 ácidos fenólicos, incluyendo el ácido  $\rho$ -cumárico, ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y 3 isómeros de los ácidos cumaroilquínico, cafeoilquínico y feruloilquínico. En cuanto a los flavonoides, se identificaron 14 compuestos en los extractos de aguacate estudiados, además de las catequinas y taninos condensados (procianidinas). Estos flavonoides fueron la quercetina, el kaempferol, la rutina, la naringenina y la sakuranetina, así como diferentes formas glucosiladas de quercetina, luteolina y kaempferol. En cuanto a las catequinas, se identificaron (+)-catequina, (-)-epicatequina y (epi)galocatequina. Por otra parte, el grupo de los taninos condensados presentó el mayor número de compuestos, con 24 isómeros de dímeros y trímeros de procianidinas (Proc.) A y B.

Además, se caracterizaron tres derivados de alcohol fenólico, específicamente tres derivados del tirosol, el hidroxitirosol glucósido, tirosol glucósido y tirosil glucosil-pentósido. Por último, se identificaron compuestos pertenecientes a otro tipo de compuestos polares, el ácido vanílico y vanilina, perseitol, pirocatecol, penstemida y ácido hidroabscísico glucósido. Los datos de cuantificación de los diferentes extractos para todos los compuestos agrupados por familias se resumen en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Cuantificación de los compuestos identificados en los extractos de piel y semilla de aguacate en función de la temperatura de secado. Se muestran los valores de concentración en mg por cada 100 gramos de materia seca  $\pm$  SD. En negrita se resalta el valor de cada compuesto en el extracto que presenta la mayor concentración. ND indica compuesto no detectado. Dentro de cada grupo, los compuestos están ordenados según su tiempo de retención. Dentro de los flavonoides, se subdividen los subgrupos de catequinas y taninos condensados.

Compuestos	Concentración (mg/100 g materia seca) en extractos de <b>piel (P)</b> y <b>semilla (S)</b> de aguacate					
	45°C(P45)	65°C(P65)	85°C(P85)	45°C(S45)	65°C(S65)	85°C(S85)
<b>Flavonoides</b>						
Quercetina-diglucósido isómero 1	2,8 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,1	<b>23,5 <math>\pm</math> 0,8</b>	1,7 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0
Quercetina-diglucósido isómero 2	1,2 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,1	<b>6,3 <math>\pm</math> 0,2</b>	1,6 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1
Quercetina-O-arabinosil-glucósido	2,7 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,2	<b>23,3 <math>\pm</math> 0,3</b>	ND	ND	ND
Rutina	1,6 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,0	<b>8,2 <math>\pm</math> 0,2</b>	ND	ND	ND
Luteolina pentosil-hexósido	1,4 $\pm$ 0,0	2,7 $\pm$ 0,0	<b>4,8 <math>\pm</math> 0,2</b>	ND	ND	ND
Quercetina-3- $\beta$ -glucósido	ND	0,6 $\pm$ 0,1	<b>10,6 <math>\pm</math> 0,4</b>	1,8 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,0
Quercetina glucurónido	1,2 $\pm$ 0,0	2,1 $\pm$ 0,1	<b>5,7 <math>\pm</math> 0,3</b>	ND	ND	ND
Multinósido A	9,7 $\pm$ 0,2	21,6 $\pm$ 0,9	<b>85,0 <math>\pm</math> 1,0</b>	ND	ND	ND
Quercetina xilosil-ramnósido	2,08 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,2	<b>11,0 <math>\pm</math> 0,2</b>	ND	ND	ND
Kaempferol-O-ramnosil-glucósido	2,4 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	<b>12,4 <math>\pm</math> 0,1</b>	ND	ND	ND

Quercetina	2,2 ± 0,1	5,0 ± 0,2	<b>15,2 ± 0,2</b>	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,0
Kaempferol	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1	<b>5,1 ± 0,1</b>	1,4 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,3 ± 0,0
(±)-Naringenina	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,0	<b>2,6 ± 0,1</b>
Sakuranetina	2,1 ± 0,0	1,7 ± 0,0	2,2 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,0	<b>2,5 ± 0,1</b>
<b>Catequinas</b>						
(+)-Catequina	21,7 ± 0,1	22,6 ± 0,3	<b>135,0 ± 2,0</b>	63,0 ± 3,0	82,0 ± 1,0	69,0 ± 4,0
(-)-Epicatequina	7,8 ± 0,1	9,0 ± 0,1	<b>51,0 ± 2,0</b>	32,0 ± 0,1	30,5 ± 0,8	44,0 ± 3,0
(Epi)galocatequina	13,5 ± 0,1	17,4 ± 0,1	21,1 ± 0,1	21,4 ± 0,2	<b>26,0 ± 0,6</b>	22,3 ± 0,6
<b>Taninos condensados</b>						
Proc. dímero B isómero 1	ND	ND	8,4 ± 0,3	7,5 ± 0,2	<b>8,5 ± 0,2</b>	5,9 ± 0,3
Proc. dímero B isómero 2	ND	ND	<b>14,1 ± 0,9</b>	9,8 ± 0,4	9,7 ± 0,2	8,7 ± 0,1
Proc. dímero B isómero 3	ND	ND	<b>11,3 ± 0,4</b>	5,6 ± 0,3	5,8 ± 0,1	6,9 ± 0,2
Proc. dímero B isómero 4	ND	ND	<b>51,0 ± 5,0</b>	15,6 ± 0,3	11,4 ± 0,1	28,0 ± 3,0
Proc. trímero A isómero 1	ND	ND	ND	<b>57,0 ± 2,0</b>	49,1 ± 0,1	32,0 ± 4,0
Proc. trímero A isómero 2	ND	ND	ND	62,0 ± 1,0	52,5 ± 0,6	<b>84,0 ± 4,0</b>
Proc. dímero B isómero 5	ND	ND	<b>16,7 ± 0,5</b>	ND	ND	ND
Proc. trímero B isómero 1	ND	ND	<b>19,7 ± 0,5</b>	ND	ND	14,2 ± 0,2
Proc. dímero B isómero 6	ND	ND	<b>7,9 ± 0,2</b>	ND	ND	ND
Proc. trímero B isómero 2	ND	ND	<b>7,7 ± 0,2</b>	ND	ND	ND
Proc. trímero A isómero 3	ND	ND	ND	21,8 ± 0,5	<b>31,0 ± 0,5</b>	11,4 ± 0,5
Proc. trímero A isómero 4	ND	ND	ND	38,0 ± 1,0	<b>44,5 ± 0,5</b>	35,0 ± 1,0
Proc. dímero B isómero 7	ND	ND	<b>15,0 ± 1,0</b>	ND	ND	ND
Proc. dímero A isómero 1	6,4 ± 0,1	7,0 ± 0,1	<b>21,0 ± 1,0</b>	14,8 ± 0,1	17,6 ± 0,1	14,2 ± 0,3
Proc. dímero B isómero 8	ND	ND	<b>11,0 ± 1,0</b>	6,2 ± 0,2	6,1 ± 0,1	10,0 ± 1,0
Proc. dímero A isómero 2	6,0 ± 0,1	6,7 ± 0,1	<b>15,0 ± 0,4</b>	8,8 ± 0,1	10,7 ± 0,1	9,0 ± 0,1

Proc. dímero A isómero 3	5,4 ± 0,1	6,7 ± 0,1	12,9 ± 0,5	12,9 ± 0,2	13,2 ± 0,1	<b>14,5 ± 0,4</b>
Proc. dímero A isómero 4 (A2)	5,9 ± 0,0	6,7 ± 0,1	<b>13,4 ± 0,6</b>	9,7 ± 0,1	11,3 ± 0,1	10,1 ± 0,2
Proc. dímero A isómero 5	ND	ND	9,5 ± 0,3	8,2 ± 0,1	<b>10,1 ± 0,0</b>	8,5 ± 0,1
Proc. dímero A isómero 6	5,6 ± 0,0	6,5 ± 0,1	<b>12,2 ± 0,2</b>	9,0 ± 0,1	10,8 ± 0,1	9,5 ± 0,5
Proc. dímero A isómero 7	ND	ND	8,1 ± 0,1	8,5 ± 0,1	<b>10,5 ± 0,1</b>	7,8 ± 0,0
Proc. dímero A isómero 8	ND	ND	7,4 ± 0,1	7,6 ± 0,1	<b>9,4 ± 0,2</b>	ND
Proc. dímero A isómero 9	ND	ND	ND	8,1 ± 0,0	<b>9,6 ± 0,0</b>	8,0 ± 0,1
Proc. dímero B isómero 9	ND	ND	<b>6,8 ± 0,2</b>	ND	ND	ND
<b>Ácidos fenólicos</b>						
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	11,7 ± 0,4	13,9 ± 0,6	16,6 ± 0,3	19,5 ± 0,7	19,7 ± 0,2	<b>24,9 ± 0,3</b>
Ácido protocatecuico	11,4 ± 0,1	<b>14,8 ± 0,3</b>	10,4 ± 0,2	ND	ND	ND
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	ND	ND	21,3 ± 0,9	<b>150,0 ± 10,0</b>	111,0 ± 9,0	26,5 ± 0,4
Ácido 4-hidroxibenzoico	47,0 ± 2,0	56,6 ± 0,4	<b>83,0 ± 6,0</b>	66,0 ± 4,0	66,0 ± 2,0	67,0 ± 2,0
Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico	ND	ND	ND	<b>46,3 ± 0,6</b>	41,4 ± 0,5	11,5 ± 0,2
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	ND	ND	87,0 ± 3,0	74,0 ± 0,9	<b>95,0 ± 9,0</b>
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	ND	ND	<b>131,0 ± 4,0</b>	ND	15,5 ± 0,3	ND
Ácido 3-feruloilquínico	ND	ND	ND	14,2 ± 0,3	<b>14,8 ± 0,2</b>	ND
Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	ND	ND	61,0 ± 2,0	76,8 ± 0,6	<b>120,0 ± 1,0</b>	36,3 ± 0,4
Ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico	ND	ND	ND	8,47 ± 0,1	<b>12,8 ± 0,2</b>	ND
Ácido 4- <i>p</i> -cumaroilquínico	ND	ND	ND	27,1 ± 0,5	<b>44,0 ± 1,0</b>	15,4 ± 0,6
Ácido 4-feruloilquínico	ND	ND	ND	9,3 ± 0,2	<b>13,5 ± 0,3</b>	ND
Ácido 5-feruloilquínico	ND	ND	ND	20,1 ± 0,9	<b>25,0 ± 1,0</b>	9,6 ± 0,1
<b>Derivados de alcoholes fenólicos</b>						
Hidroxitirosol glucósido	ND	ND	ND	<b>40,0 ± 1,0</b>	<b>40,0 ± 1,0</b>	16,0 ± 0,7

Tirosol glucósido	ND	ND	ND	31,0 ± 2,0	<b>41,4 ± 0,3</b>	17,9 ± 0,5
Tirosol glucosil-pentósido	7,4 ± 0,2	10,8 ± 0,2	28,2 ± 0,6	63,0 ± 1,0	<b>110,0 ± 10,0</b>	29,0 ± 1,0
<b>Ácidos orgánicos</b>						
Ácido quínico	ND	ND	ND	627,0 ± 3,0	<b>800,0 ± 20,0</b>	260,0 ± 10,0
Ácido cítrico	ND	ND	ND	68,0 ± 2,0	<b>68,9 ± 0,9</b>	33,2 ± 0,7
<b>Otros compuestos polares</b>						
Perseitol	ND	ND	ND	238,0 ± 6,0	<b>255,0 ± 2,0</b>	107,0 ± 2,0
Pirocatecol	8,9 ± 0,1	10,1 ± 0,1	9,6 ± 0,1	13,8 ± 0,3	14,9 ± 0,2	<b>16,1 ± 0,6</b>
Penstemida	ND	ND	ND	11,1 ± 0,3	<b>12,4 ± 0,2</b>	4,2 ± 0,3
Ácido vanílico	7,0 ± 0,2	10,3 ± 0,1	11,4 ± 0,1	11,5 ± 0,3	<b>13,6 ± 0,4</b>	ND
Vanilina	30,2 ± 0,9	25,3 ± 0,6	25,9 ± 0,1	28,0 ± 1,0	<b>31,8 ± 0,7</b>	22,7 ± 0,1
Ácido hidroxiaabscísico glucósido	ND	ND	ND	900,0 ± 40,0	<b>1050,0 ± 40,0</b>	280,0 ± 20,0

La familia de compuestos de los flavonoides predominó en los extractos de piel de aguacate, siendo el compuesto (+)-catequina el mayoritario, con una concentración de 135 mg/100 g materia seca en el extracto P85. Además, la mayor concentración de casi todos los flavonoides se obtuvo en el extracto P85. En el caso de los extractos P45 y P65, solo se identificaron 5 isoformas de procianidina, mientras que en el extracto P85 se identificaron 19.

Por otra parte, no se identificaron ácidos orgánicos en los extractos de piel, solo 1 derivado de alcohol fenólico, el tirosol glucosil-pentósido y 3 compuestos pertenecientes a otros compuestos polares, el pirocatecol, el ácido vanílico y vanilina. En cuanto a los ácidos fenólicos, en los extractos P45 y P65 se identificaron 3

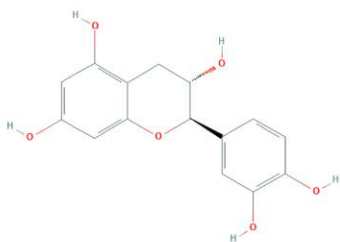
compuestos pertenecientes a este grupo, mientras que en el extracto P85 se encontraron 6, siendo el mayoritario el ácido 5-*O*-cafeoilquínico, con una concentración de 131 mg/100 g de materia seca. En este extracto, como ya se ha comentado, el compuesto mayoritario fue la catequina, con una concentración de 135 mg/100 g de materia seca (**Figura 29**).

En cuanto a los extractos de semilla de aguacate, se encontró un menor número de flavonoides que en los extractos de piel. Por otro lado, de las 24 isoformas de procianidina que se identificaron en total, 19 de ellas se encontraron en los extractos de semilla de aguacate y 10 de estas 19 isoformas presentaron una mayor concentración en los extractos de semilla que en los de piel de aguacate.

Por último, los extractos de semilla de aguacate presentaron generalmente la mayor concentración para los compuestos pertenecientes a los grupos de los ácidos fenólicos, derivados de alcoholes fenólicos y otros compuestos polares. Además, se encontraron dos ácidos orgánicos, el ácido quínico y el ácido cítrico, que no se encontraron en los extractos de piel de aguacate. Dentro de los extractos de semilla de aguacate, el extracto S65 fue el que presentó la concentración más alta de la mayoría de los compuestos pertenecientes a estos grupos. El compuesto obtenido en mayor concentración en este extracto fue el ácido hidroxibscísico glucósido, del cual se obtuvo 1050 mg/100 g de materia seca, seguido del ácido quínico, con una concentración de 800 mg/100 g de materia seca (**Figura 29**).

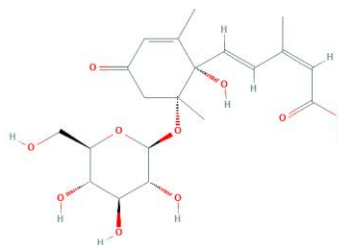


**Piel de aguacate**

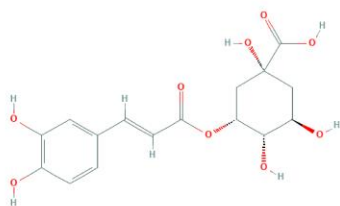


(+)-Catequina

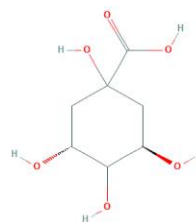
**Semilla de aguacate**



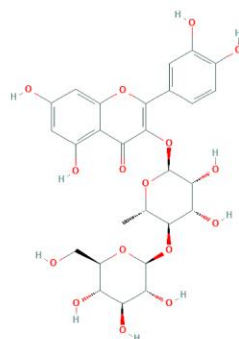
Ácido hidroxiabscísico glucósido



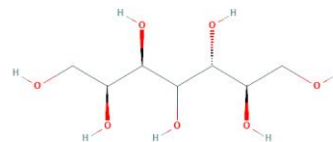
Ácido 5-O-cafeoilquínico  
o ácido neoclorogénico



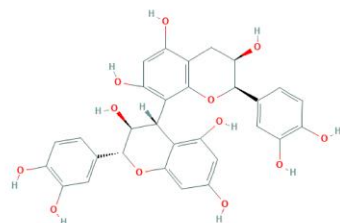
Ácido quínico



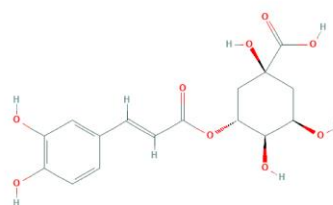
Multinósido A



Perseitol



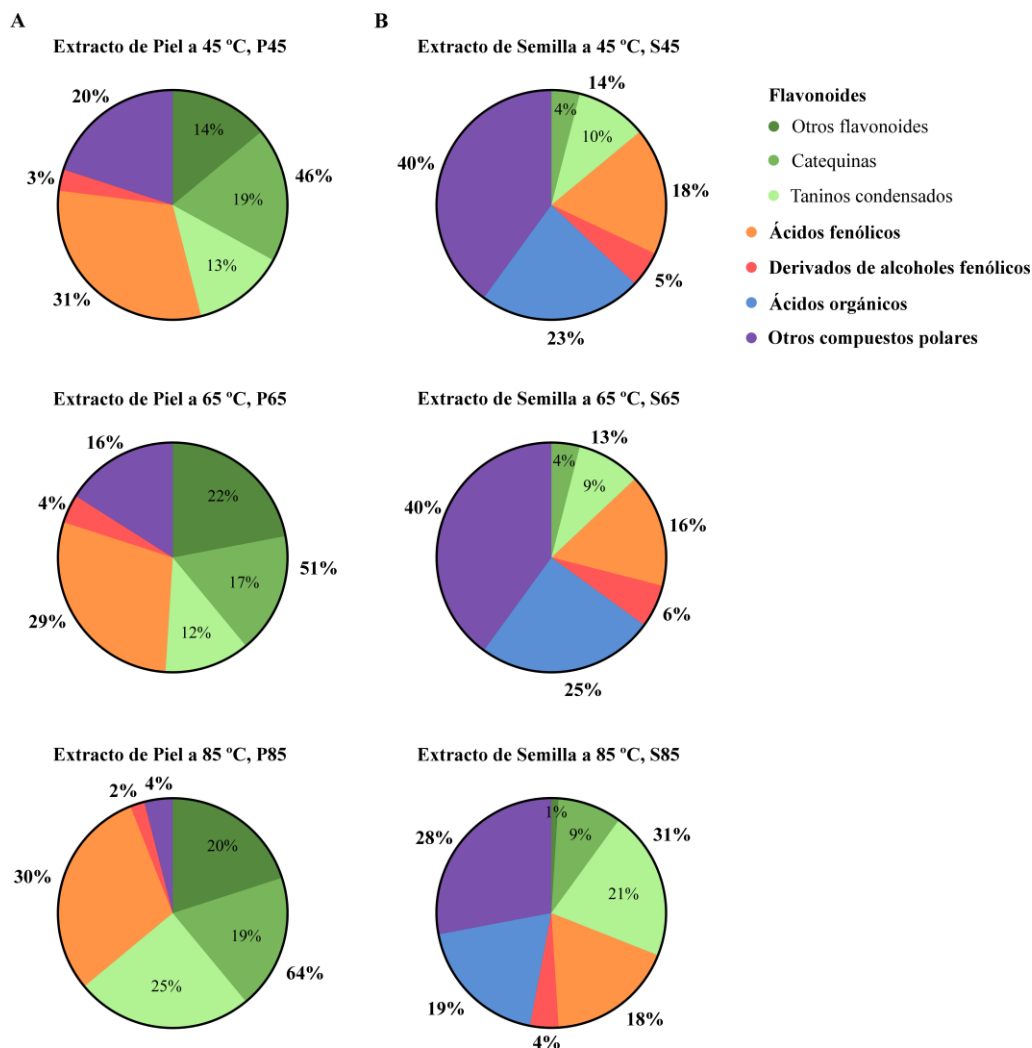
Procianidina dímero B isómero 4



Ácido 3-O-cafeoilquínico  
o ácido clorogénico

**Figura 29.** Compuestos más representativos de los extractos de piel y de semilla de aguacate. La representación de los compuestos fue obtenida de PubChem.

Estos resultados se representaron en diagramas, mostrándose el porcentaje de las familias de compuestos para cada extracto de piel y semilla de aguacate (**Figura 30**). En el grupo de flavonoides se incluyen los subgrupos de catequinas y taninos condensados.



**Figura 30.** Diagramas de porcentajes de contenido de cada familia de compuestos para los extractos de piel (**A**) y semilla (**B**) de aguacate obtenidos a 45, 65 y 85 °C. Dentro del porcentaje de flavonoides se desglosa el contenido en catequinas, taninos condensados y otros flavonoides.

Los compuestos mayoritarios identificados en los extractos de piel de aguacate pertenecieron al grupo de flavonoides en los tres extractos, P45, P65 y P85, correspondiendo con un 46, 51 y 64%, respectivamente. Los porcentajes de catequinas en los 3 extractos se situaron entre un 17-19%, mientras que en los taninos condensados este porcentaje se elevó de forma significativa hasta el 25% en el extracto P85, respecto al 12% y 13% de los extractos P45 y P65. El segundo grupo más abundante en los extractos de piel de aguacate fue el de ácidos fenólicos. En los tres extractos se obtuvo en torno a un 30% respecto al total. Asimismo, se determinaron otros compuestos polares, con un 20, 16 y 4%, respectivamente en los tres extractos P45, P65 y P85. Por otra parte, la disminución del porcentaje observada en el grupo de otros compuestos polares coincide con el aumento de la concentración de otros compuestos, por lo que se descarta que se deba al aumento de la temperatura de secado, ya que como se puede observar en la **Tabla 11**, la concentración de los compuestos pirocatecol, ácido vanílico y vanilina no presentó una disminución en el extracto P85. Por último, en los extractos de piel no se observaron compuestos pertenecientes al grupo de ácidos orgánicos y el porcentaje de derivados de alcoholes fenólicos fue poco relevante, ya que como se puede observar en la **Tabla 11**, solo se identificó el compuesto tirosol glucosil-pentósido en estos extractos.

En cuanto a los extractos de semilla de aguacate, los compuestos mayoritarios fueron los pertenecientes al grupo de otros compuestos polares, con un 40% para los extractos S45 y S65 y con un 28% para el extracto S85. Los siguientes grupos de compuestos por orden decreciente fueron los ácidos orgánicos y ácidos fenólicos, con

un 19-25% y un 16-18%, respectivamente. Del mismo modo que en los extractos de piel de aguacate, se obtuvo un porcentaje bajo de derivados de alcoholes fenólicos, de un 5%. Por último, en el extracto S85 se observó un aumento considerable del porcentaje de flavonoides respecto a los otros extractos de semilla de aguacate. Tal y como se puede observar en la **Tabla 11**, este aumento se debió a una menor concentración de las otras familias de compuestos, en concreto a una disminución del grupo de otros compuestos polares y no a un aumento en la concentración de flavonoides.

## **2. Determinación de la actividad biológica de los extractos de piel y semilla de aguacate**

Una vez caracterizados los extractos, se determinó su actividad biológica mediante diferentes técnicas con el fin de seleccionar aquellos con un mayor interés para el desarrollo de nuevos y potenciales ingredientes para productos dermocosméticos. Para ello, se siguió una estrategia similar a la desarrollada en el Capítulo 1 de esta tesis. En primer lugar, se estudió su contenido fenólico y su actividad antioxidante. Posteriormente, se determinó el efecto melanogénico y fotoprotector en modelos celulares de piel. A lo largo de los distintos ensayos se fueron seleccionando los extractos que mostraron mayor actividad y finalmente se escogió el extracto candidato para ser postulado como nuevo principio activo para el desarrollo de novedosos productos dermocosméticos.

### 2.1 Contenido fenólico y capacidad antioxidante de los extractos de aguacate mediante los ensayos Folin y TEAC

El primer ensayo consistió en determinar el contenido fenólico total de los tres extractos de piel de aguacate (P45, P65 y P85) y los tres de semilla de aguacate (S45, S65 y S85) mediante el ensayo Folin-Ciocalteu. El contenido fenólico se relaciona con una mayor actividad antioxidante y otras actividades biológicas relevantes, por lo que es un indicativo de qué extracto podría ser el más activo. Además, se estudió la capacidad antioxidante de los extractos mediante el ensayo TEAC. Los resultados para los dos ensayos se pueden observar en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Porcentaje de ácido gálico equivalente (% GAE)  $\pm$  SD determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y capacidad antioxidante en mmol trolox Eq./100 g extracto  $\pm$  SD, determinada mediante el ensayo TEAC para los extractos de piel de aguacate, P45, P65 y P85, y para los de semilla de aguacate, S45, S65 y S85. Las letras *a*, *b* y *c* muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes extractos ( $p < 0,05$ ). Además, se resalta en negrita el extracto que presenta la actividad más alta para cada ensayo.

Extracto	Folin % GAE (v/v)	TEAC mmol trolox Eq./100 g extracto
P45	13,94 $\pm$ 2,87 <sup>a</sup>	255,11 $\pm$ 20,96 <sup>a</sup>
P65	17,77 $\pm$ 2,09 <sup>ab</sup>	<b>264,30 <math>\pm</math> 28,29 <sup>a</sup></b>
P85	<b>21,74 <math>\pm</math> 4,43 <sup>b</sup></b>	263,83 $\pm$ 20,92 <sup>a</sup>
S45	15,40 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	187,00 $\pm$ 29,73 <sup>b</sup>
S65	11,77 $\pm$ 0,49 <sup>ac</sup>	137,18 $\pm$ 14,95 <sup>c</sup>
S85	20,30 $\pm$ 2,79 <sup>b</sup>	157,05 $\pm$ 24,69 <sup>bc</sup>

Los extractos que mostraron un mayor contenido fenólico fueron los extraídos tras una temperatura de secado de 85 °C. En particular, destacó el extracto P85, con un

contenido del 21,74%, seguido del extracto S85, con un contenido fenólico del 20,30%, y del extracto P65, con un 17,77%. Sin embargo, los extractos que mostraron una mayor capacidad antioxidante fueron los tres extractos de piel de aguacate, en torno a 260 mmol trolox Eq./100 g extracto con una alta significancia estadística (de al menos  $p < 0,001$ ), en comparación con los tres extractos de semilla de aguacate, cuyo valor más elevado, de 187 mmol trolox Eq./100 g extracto, se obtuvo con el extracto S45.

En base a estos resultados, se decidió continuar con los extractos de piel de aguacate, ya que los valores de contenido fenólico fueron similares mientras que la capacidad antioxidante obtenida fue considerablemente mayor que la observada en los extractos de semilla de aguacate. Por lo tanto, los siguientes ensayos se realizaron utilizando únicamente los extractos P45, P65 y P85.

## **2.2 Capacidad antioxidante en los ensayos FRAP y ORAC de los extractos de piel de aguacate**

Con el fin de profundizar en el estudio de las propiedades antioxidantes de los extractos de piel de aguacate, se realizaron los ensayos FRAP y ORAC, los cuales están basados en diferentes mecanismos. El ensayo FRAP determina la capacidad de reducción del hierro mediante un mecanismo de transferencia de un electrón y el ensayo ORAC determina la capacidad de inhibir a los radicales peroxilo mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno [177]. Los resultados de estos ensayos se pueden observar en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Capacidad antioxidante de los extractos P45, P65 y P85 mediante los ensayos FRAP y ORAC. El ensayo FRAP determina la actividad comparado con el sulfato de hierro y el ensayo ORAC respecto al trolox. Todos los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD. Las letras *a*, *b* y *c* muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes extractos ( $p < 0,05$ ). Se resalta en negrita el extracto que presenta la actividad más alta para cada ensayo.

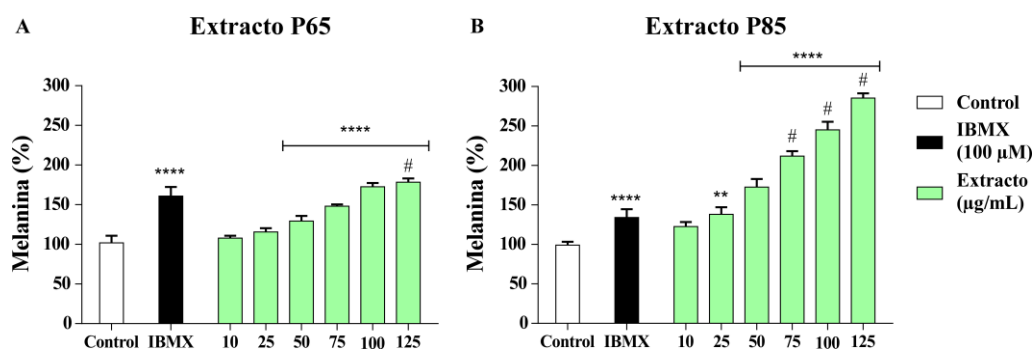
Extracto	FRAP	ORAC
	mmol FeSO <sub>4</sub> Eq./100 g extracto	mmol trolox Eq./100 g extracto
<b>P45</b>	103,29 $\pm$ 6,46 <sup>a</sup>	82,17 $\pm$ 4,11 <sup>a</sup>
<b>P65</b>	103,70 $\pm$ 5,34 <sup>a</sup>	<b>109,26 <math>\pm</math> 2,10</b> <sup>b</sup>
<b>P85</b>	<b>243,65 <math>\pm</math> 26,97</b> <sup>b</sup>	96,15 $\pm$ 0,77 <sup>c</sup>

El extracto P85 mostró una actividad considerablemente mayor en el ensayo FRAP, de más del doble que los otros dos extractos, 243 frente a un 103 mmol FeSO<sub>4</sub> Eq./100 g extracto ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, en el ensayo ORAC los tres extractos mostraron una actividad antioxidante similar, aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre todos ellos. Los dos extractos más activos fueron P65 y P85, mostraron una actividad de 109,26 y 96,15 mmol trolox Eq./100 g extracto, respectivamente.

El extracto P45 mostró la menor actividad antioxidante en el ensayo ORAC, de 82,17 mmol trolox Eq./100 g de extracto, así como en el ensayo TEAC y el menor contenido fenólico, determinado en el apartado anterior. Debido a estos resultados, se decidió descartar el extracto P45 para los siguientes ensayos.

### 2.3 Inducción de la melanogénesis en la línea celular B16-F10 de los extractos P65 y P85

Con el objetivo de estudiar la actividad moduladora de la síntesis de melanina de los extractos de piel de aguacate, se evaluó la capacidad de los extractos P65 y P85 de inducir la melanogénesis en la línea celular de melanocitos B16-F10. Para ello, se utilizó como control positivo de inducción de melanogénesis el compuesto IBMX (100  $\mu$ M) y se realizó el tratamiento con los extractos a distintas concentraciones (10-125  $\mu$ g/mL), tal y como se describe en la Metodología. Ningún tratamiento a las concentraciones utilizadas afectó a la viabilidad celular (datos no mostrados). Se calculó el porcentaje de melanina tomando como referencia 100% el control con el vehículo para los dos extractos (Figura 31).



**Figura 31.** Determinación de la inducción de melanogénesis producida por los extractos P65 (A) y P85 (B) en la línea celular B16-F10 tras 72 horas de tratamiento (10-125  $\mu$ g/mL del extracto correspondiente). Se muestra el control positivo de aumento de melanogénesis IBMX. Los valores están normalizados respecto al control del vehículo sin tratamiento (Control) y se representan como la media  $\pm$  SD (n=6). \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas comparado con el control negativo y # muestra un aumento estadísticamente significativo respecto al IBMX ( $p < 0,05$ ).



Ambos extractos presentaron un efecto inductor de la melanogénesis, siendo el más activo el extracto P85. El extracto P65 mostró un incremento en la síntesis de melanina de forma dosis-respuesta y significativa a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$ , llegando a superar al control positivo de IBMX a partir de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Por otro lado, el extracto P85 mostró un comportamiento similar dosis-respuesta al extracto P65. Sin embargo, la significancia estadística se consiguió a dosis más bajas, a partir de 25  $\mu\text{g/mL}$ , concentración a la que supera al control positivo IBMX. Además, el extracto alcanzó una inducción de la melanogénesis de casi un 300% a la concentración más alta utilizada (125  $\mu\text{g/mL}$ ). Por lo tanto, el extracto P85 presenta una fuerte capacidad de inducir la melanogénesis sin disminuir la viabilidad celular.

A la luz de estos resultados y los obtenidos en los ensayos anteriores, donde el extracto P85 mostró el mayor contenido fenólico y capacidad antioxidante, se seleccionó este extracto para continuar su caracterización biológica en etapas sucesivas, evaluando sus propiedades antioxidantes y fotoprotectoras en un modelo celular de queratinocitos.

#### **2.4 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto P85 frente a la peroxidación lipídica y los radicales libres hidroxilo y óxido nítrico**

En las etapas sucesivas de caracterización del extracto P85, se incidió en su actividad antioxidante. Para ello, se realizaron tres nuevos ensayos antioxidantes. En primer lugar, se realizó el ensayo TBARS, que determina la actividad antioxidante frente a la peroxidación lipídica (expresado como el porcentaje de inhibición de la

peroxidación lipídica para una concentración de 0,5 mg/mL del extracto). Además, se determinó la actividad antioxidante frente a dos radicales libres, el radical hidroxilo y el óxido nítrico. Mediante el ensayo ORAC<sub>OH</sub> se determinó la eliminación del radical hidroxilo, expresado como mmol quercetina Eq./100 g extracto. Por último, se determinó la capacidad del extracto (200 µg/mL) de eliminar el radical óxido nítrico, utilizando el reactivo de Griess (% Eliminación). Los resultados de los tres ensayos se agrupan en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.** Capacidad antioxidante del extracto P85 determinada mediante el ensayo TBARS (% inhibición de la peroxidación lipídica de 0,5 mg/mL del extracto), una modificación del ensayo ORAC (mmol quercetina Eq./100 g extracto) y la eliminación del óxido nítrico (% Eliminación). Todos los resultados están expresados como la media ± SD.

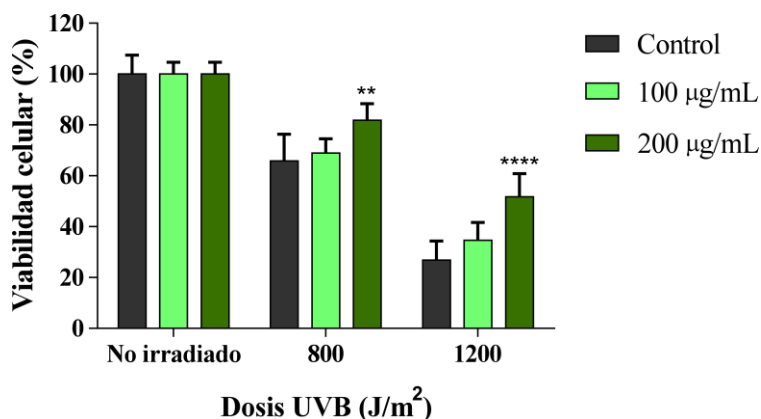
Extracto	TBARS	ORAC <sub>OH</sub>	% Eliminación NO
<b>P85</b>	94,66 ± 20,76	24,01 ± 0,26	38,56 ± 0,01

El extracto de piel de aguacate P85 mostró una capacidad antioxidante significativa en los tres ensayos realizados. Se observó una inhibición casi total de la peroxidación lipídica con un tratamiento de 0,5 mg/mL, además de una alta inhibición de los radicales hidroxilo y óxido nítrico, superior a la observada con el extracto de rabo de cereza scSFE, en el Capítulo 1 de esta Tesis doctoral (45,13% de inhibición de la peroxidación lipídica a 5 mg/mL del extracto scSFE). En el ensayo ORAC<sub>OH</sub> el extracto P85 mostró una actividad de 24,01 mmol quercetina Eq./100 g mientras que para el extracto scSFE fue de 18,91 mmol quercetina Eq./100 g extracto. De igual forma, el extracto P85

eliminó el radical óxido nítrico un 38,56% respecto a un 29,37% del extracto scSFE. Estos datos evidencian la alta capacidad de inhibir el estrés oxidativo del extracto P85 mediante diferentes mecanismos antioxidantes, tal y como se ha visto en los diferentes ensayos realizados.

### 2.5 Fotoprotección del extracto de piel de aguacate P85 contra la radiación UVB

Tras completar la evaluación de las propiedades antioxidantes, se continuó con el estudio de la capacidad fotoprotectora del extracto P85 frente a la radiación UVB en un modelo celular de piel. Para ello, se irradió con UVB la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT en presencia o en ausencia del extracto y se determinó la viabilidad celular a las 24 horas mediante el ensayo de viabilidad celular MTT (**Figura 32**).



**Figura 32.** Efecto en la viabilidad celular del extracto P85 (100 o 200 µg/mL) 24 horas después de irradiar con UVB (800 o 1200 J/m<sup>2</sup>). Los valores se representan como la media de los datos ± SD (n=6) normalizados respecto al tratamiento correspondiente no irradiado (100%). \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control irradiado en ausencia del extracto para la correspondiente dosis de UVB.

Además, se calculó el porcentaje de fotoprotección del extracto en comparación con su respectiva condición irradiada sin tratamiento para determinar el aumento de viabilidad celular que provoca el extracto en cada condición (**Tabla 15**).

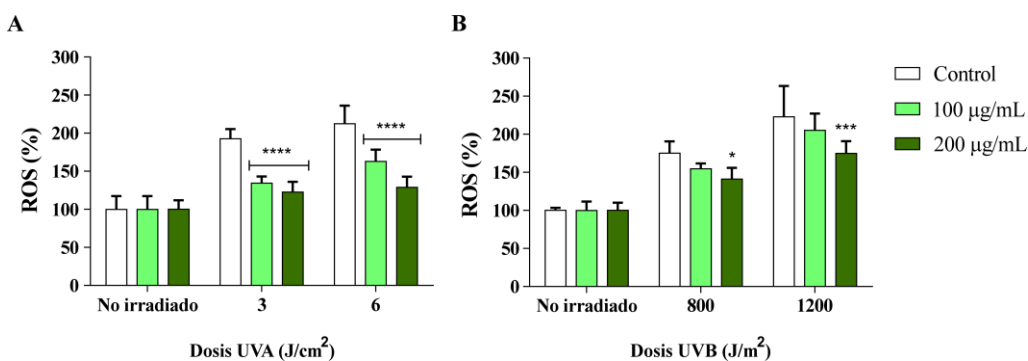
**Tabla 15.** Porcentaje de fotoprotección del extracto P85 (100 o 200  $\mu\text{g/mL}$ ) tras la irradiación con 800 o 1200  $\text{J/m}^2$  de UVB.

Extracto P85 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fotoprotección (%)	
	Dosis de UVB	
	800 $\text{J/m}^2$	1200 $\text{J/m}^2$
100	9,00	10,63
200	46,90	34,06

El extracto P85 no mostró un efecto fotoprotector estadísticamente significativo con el tratamiento a 100  $\mu\text{g/mL}$  para las dos dosis de UVB, aunque sí se observó una tendencia de efecto de fotoprotección dependiente de la dosis. A 200  $\mu\text{g/mL}$  el extracto mostró una actividad fotoprotectora estadísticamente significativa para las dos dosis de radiación UVB, siendo mayor esta protección en la dosis de 800  $\text{J/m}^2$  de UVB, donde se determinó una fotoprotección del 46,90% respecto a 34,06% de fotoprotección que se obtuvo tras la irradiación con 1200  $\text{J/m}^2$ . Estos resultados fueron superiores a los obtenidos con el extracto de rabo de cereza scSFE, que obtuvo la mayor fotoprotección, de 36,53%, con el tratamiento de 200  $\mu\text{g/mL}$  y 800  $\text{J/m}^2$  de UVB.

## 2.6 Inhibición de la producción de ROS intracelular inducida por la radiación UVA y UVB mediante el tratamiento con el extracto P85

De igual forma, se determinó si el extracto de piel de aguacate P85 era capaz de reducir el estrés oxidativo inducido por la radiación UVA y UVB en la línea celular HaCaT. Para ello, se midieron los radicales libres intracelulares mediante la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA tras la irradiación con UVA (3 y 6 J/cm<sup>2</sup>) y UVB (800 y 1200 J/m<sup>2</sup>), en presencia y en ausencia del tratamiento (100 y 200 µg/mL del extracto P85). Además, se utilizaron controles no irradiados de cada condición para normalizar el estrés oxidativo, calculado como porcentaje de ROS intracelular (**Figura 33**).



**Figura 33.** Determinación de la actividad antioxidante del extracto P85 frente al estrés oxidativo inducido por la radiación UVA (**A**) y UVB (**B**) en la línea celular HaCaT. Los valores de fluorescencia están normalizados respecto a los controles no irradiados. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SD (n=6). \* ( $p < 0,05$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la dosis correspondiente de UVA (3 o 6 J/cm<sup>2</sup>) y UVB (800 o 1200 J/m<sup>2</sup>) en ausencia del extracto.

Además, se calculó el porcentaje de inhibición del estrés oxidativo del extracto en comparación con la respectiva condición irradiada sin tratamiento, tal y como se explica en la sección de Metodología (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Porcentaje de inhibición del estrés oxidativo del extracto P85 (100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ ) inducido por la radiación UVA (3 y 6  $\text{J/cm}^2$ ) y UVB (800 y 1200  $\text{J/m}^2$ ).

Extracto P85 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibición del estrés oxidativo (%)			
	Dosis UVA		Dosis UVB	
	3 $\text{J/cm}^2$	6 $\text{J/cm}^2$	800 $\text{J/m}^2$	1200 $\text{J/m}^2$
100	63,00	44,10	27,47	14,45
200	75,59	74,27	45,42	38,94

El extracto P85 mostró una actividad antioxidante estadísticamente significativa frente a la radiación UVA para todos los tratamientos realizados de una forma dosis-respuesta, mientras que para la UVB solo mostró una actividad estadísticamente significativa a 200  $\mu\text{g/mL}$  del extracto. La inhibición del estrés oxidativo fue dosis-dependiente para todas las condiciones (dosis y tipo de UV) probadas. La mayor inhibición de ROS se obtuvo frente a la dosis de 3  $\text{J/cm}^2$  de UVA, llegando hasta el 75,59%. De la misma forma, en el caso del UVB se obtuvo la mayor reducción del estrés oxidativo con la menor dosis de UV empleado (800  $\text{J/m}^2$ ). Para esta dosis se observó una reducción del estrés oxidativo de 45,42% con 200  $\mu\text{g/mL}$  del extracto P85. Esta reducción del estrés oxidativo fue similar a la obtenida con el extracto de rabo de cereza scSFE, ya que mostró mayor actividad a 100  $\mu\text{g/mL}$  con las dosis más bajas de radiación UV y, además, la mayor actividad se obtuvo con la concentración de scSFE más alta, observándose un 82,42% de inhibición con la dosis de 3  $\text{J/cm}^2$  de UVA con 200  $\mu\text{g/mL}$ .

Los ensayos celulares y los antioxidantes muestran que el extracto P85 presenta una actividad antioxidante considerable, que ejerce mediante diferentes procesos y frente a distintos radicales libres, incluso superior a la actividad mostrada por el extracto scSFE. Además, presenta una elevada capacidad de inducir melanogénesis y tiene actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA y UVB, mostrando cualidades interesantes para ser utilizado como ingrediente cosmético.





## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



### **1. La actividad antioxidante de los extractos de aguacate se debe a los compuestos fenólicos**

En el presente trabajo se estudió el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de 3 extractos de piel y 3 de semilla de aguacate, obtenidos mediante 3 diferentes temperaturas de secado, 45, 65 y 85 °C.

En los extractos de piel de aguacate utilizados en este estudio se observa una correlación directa de la temperatura de secado con el contenido fenólico, mientras que en los extractos de semilla de aguacate no se observa dicha correlación. Por otro lado, el extracto de semilla que presenta un mayor contenido fenólico es el S85, por lo que la temperatura de secado más alta de 85 °C presumiblemente produce un aumento del contenido fenólico para ambas materias primas.

De hecho, Saavedra *et al.* estudiaron mediante un modelo computacional la temperatura de secado óptima para la obtención de un extracto con mayor actividad. Según este trabajo, la temperatura óptima de secado para la extracción de piel de aguacate es de 73 °C, mientras que para el extracto de semilla de aguacate es de 66 °C. Además, obtuvieron una predicción de valores de contenido fenólico a estas temperaturas de 5,2 y 4,1 % de GAE para piel y semilla de aguacate, respectivamente [178]. Estos valores de contenido fenólico son muy inferiores a los obtenidos en el presente trabajo, ya que el proceso de extracción permite la obtención de compuestos fenólicos de una forma relativamente específica, mientras que en el artículo de la bibliografía se llevó a cabo una deshidratación. No obstante, este artículo aporta información del rango de temperatura que se puede utilizar en la extracción de

polifenoles para obtener el mayor contenido fenólico sin producir la degradación de los compuestos activos.

Los 6 extractos utilizados en este estudio mostraron un alto contenido fenólico, entre 11 y 22% GAE, y una alta capacidad antioxidante, entre 137 y 264 mmol de trolox equivalente por 100 gramos de extracto, determinada mediante el ensayo TEAC.

Rodríguez-Carpena *et al.* utilizaron tres disolventes y dos variedades de aguacate para la obtención de diferentes extractos a partir de la piel y semilla y estudiaron su contenido fenólico y capacidad antioxidante. Obtuvieron valores de contenido fenólico que se encontraban en el rango de 3,3 a 17,3% de GAE para los extractos de piel y de 1,7 a 6,9% GAE para los de semilla de aguacate [179]. En otro trabajo, Ortega-Arellano *et al.* obtuvieron valores de contenido fenólico de 31,6% GAE con el extracto de piel de aguacate y de 3,9% GAE en el extracto de semilla de aguacate [180].

Estos valores son similares o inferiores a los obtenidos en el presente estudio, salvo el extracto de piel de aguacate de Ortega-Arellano *et al.*, que es un extracto obtenido con metanol y de la variedad de aguacate Colinred. Además, Segovia *et al.* establecieron que diversos extractos de semilla de aguacate encontrados en la bibliografía presentaron valores de contenido fenólico entre 0,9 y 8,8% GAE, salvo un extracto extraído con metanol:agua (3:1, v/v) que presentó un valor de 22,9% de GAE [181]. Estos resultados muestran que el método de extracción utilizado para la obtención de los extractos de este trabajo aumenta la concentración de los compuestos polifenólicos en comparación con la bibliografía, y que los disolventes metanol y etanol producen extractos con una mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Además, tal y como ocurre en los extractos de este trabajo y en otros de la bibliografía, la capacidad antioxidante de los extractos de piel de aguacate fue mayor que la de los extractos de semilla de aguacate [179, 180, 182, 183]. Sin embargo, en la bibliografía se observa que los extractos de piel de aguacate presentan un mayor contenido fenólico que los de semilla, y en este trabajo, en el que se ha empleado una técnica de extracción diferente, se observó un rango muy parecido para los tres extractos obtenidos de cada materia prima. Las diferencias en estos ensayos respecto a la bibliografía podrían deberse a que los frutos de aguacate presentan una elevada variabilidad en su composición en función del origen y de la estacionalidad del cultivo, así como de la variedad utilizada [184].

A lo largo del presente estudio se seleccionó el extracto P85 como el que presentaba la bioactividad más elevada. Este extracto presentó una alta capacidad antioxidante en todos los ensayos llevados a cabo, que establecen la capacidad antioxidante mediante diferentes métodos y frente a varios radicales libres.

En el trabajo comparativo de Segovia *et al.*, estudiaron diferentes extractos de semilla de aguacate. Obtuvieron valores entre 7,8 y 72,5 mmol trolox Eq./100 g extracto en el ensayo TEAC y en el ensayo ORAC de 13,7 a 61,6 mmol trolox Eq./100 g extracto, por lo que el extracto P85 presenta una mayor capacidad antioxidante en estos ensayos que los mostrados en este artículo, de 263,83 mmol trolox Eq./100 g extracto en el ensayo TEAC y 96,15 mmol trolox Eq./100 g extracto en el ensayo ORAC [181]. Esto se corresponde con lo esperado, ya que, por lo general, los extractos de piel de aguacate presentan una mayor actividad antioxidante que los extractos de semilla. Sin embargo,

a diferencia de otras referencias de la bibliografía y lo observado en este trabajo, Wang *et al.* obtuvieron una mayor capacidad antioxidante en los extractos de semilla de diferentes variedades de aguacate que en los extractos de piel. Obtuvieron un rango de capacidad antioxidante en el ensayo ORAC de 22,9 a 46,4 mmol trolox Eq./100 g extracto en los de semilla de aguacate y de 5,8 a 63,1 mmol trolox Eq./100 g extracto en los extractos de piel de aguacate [184]. Sin embargo, todos estos valores son inferiores al obtenido con el extracto P85, de 96,15 mmol trolox Eq./100 g extracto. La mayor capacidad antioxidante del extracto P85 podría deberse al uso del etanol como disolvente. De hecho, Segovia *et al.* establecieron que la extracción con etanol en su trabajo presentó los valores antioxidantes en torno a 60 mmol trolox Eq./100 g extracto, mientras que los extraídos con metanol presentaron valores en torno a 10 mmol trolox Eq./100 g extracto en el ensayo ORAC. De esta forma, los autores compararon dos extractos de semilla de aguacate, obtenidos mediante metanol o una mezcla de etanol:agua (1:1, v/v), y obtuvieron mayor actividad antioxidante y contenido fenólico en todos los ensayos utilizando el disolvente etanol/agua [181].

No obstante, en el extracto metanólico de piel de aguacate de variedad Colinred que estudiaron Ortega-Arellano *et al.*, obtuvieron valores de 766 mmol trolox Eq./100 g en el TEAC, 774 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g en el FRAP y 788 mmol trolox eq./100 g en el ensayo ORAC [180]. Estos valores son varias veces mayores que los obtenidos con el extracto P85, lo cual se podría justificar por el mayor contenido fenólico de este extracto, de un 31,6% respecto al 21,74% de GAE del extracto P85, a las diferencias en

el método de extracción y a la materia prima utilizada, tal y como se ha comentado anteriormente.

En cuanto a los demás ensayos antioxidantes, el tratamiento con 0,5 mg/mL del extracto P85 en el ensayo TBARS inhibió un 94,7% la peroxidación lipídica, un valor muy cercano al rango de 72,36-91,54% que observaron Rodríguez-Carpena *et al.* al tratar con un extracto de aguacate al 5% (p/p) en carne de cerdo y medir la peroxidación lipídica a los 15 días [179]. Por último, el extracto P85 mostró capacidad de inhibir a los radicales libres hidroxilo y óxido nítrico, lo cual se corresponde con otros extractos de piel de aguacate encontrados en la bibliografía y extractos de semilla y hoja de aguacate [183, 185, 186]. Esto indica que los extractos de piel de aguacate y, específicamente el extracto P85, presentan una gran capacidad de inhibir la peroxidación lipídica producida por radicales libres debido a su capacidad de inhibir directamente a los radicales libres. Esta inhibición de la peroxidación lipídica se relaciona con una de las actividades deseadas en los principios activos utilizados en productos dermocosméticos, ya que implica la protección de la piel frente al estrés oxidativo.

## **2. La actividad antioxidante del extracto P85 se podría deber principalmente a la catequina, ácido 5-O-cafeoilquínico y procianidinas**

El extracto P85 presenta una alta capacidad antioxidante, mostrada mediante diferentes ensayos. De hecho, fue seleccionado entre los 6 extractos estudiados, de piel y semilla de aguacate, por presentar esta mayor actividad. Como se ha comentado previamente, los extractos de piel de aguacate presentan mayor actividad que los de

semilla, y la mayor actividad del extracto P85 entre los 3 de piel de aguacate muestra que la temperatura de secado de 85 °C fue más eficiente para obtener compuestos bioactivos que las otras dos utilizadas, 45 y 65 °C. Por lo tanto, la mayor actividad del extracto P85 se debe a las diferencias en la composición respecto a los extractos P45 y P65, ya que este extracto incrementa significativamente la concentración de la gran mayoría de los compuestos observados en los extractos de piel de aguacate.

Además, los compuestos mayoritarios en el extracto P85 se corresponden con el grupo de flavonoides y ácidos fenólicos, siendo los compuestos mayoritarios la catequina, seguida del ácido 5-*O*-cafeoilquínico y el multinósido A. Por lo tanto, el efecto antioxidante del extracto P85 se podría deber principalmente a los flavonoides y ácidos fenólicos. Además, el extracto P85 presentó un gran número de taninos condensados que no se identificaron en los extractos P65 y P45, por lo que su mayor efecto antioxidante podría deberse también a esas procianidinas. De hecho, Wang *et al.* relacionan la actividad antioxidante de sus extractos de aguacate con el contenido de procianidinas, justificándolo con la alta correlación que observaron entre el contenido fenólico de los distintos extractos y la capacidad antioxidante observada [184], mientras que Rosero *et al.* determinaron que las fracciones de extracto de aguacate que tenían procianidinas se correspondían con las que presentaron mayor actividad antioxidante [136].

Además, las catequinas y procianidinas son algunos de los compuestos mayoritarios de otros extractos de piel de aguacate encontrados en la bibliografía que



han mostrado una capacidad antioxidante, así como los derivados del ácido cafeoilquínico [179, 181, 185].

El compuesto catequina y sus derivados han demostrado ampliamente su capacidad antioxidante en diversos ensayos antioxidantes, incluyendo el ensayo FRAP y el ABTS, y presentan un efecto protector frente a la peroxidación lipídica y a los radicales libres producidos por los generadores de radicales AAPH y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) [147, 148].

El ácido 5-*O*-cafeoilquínico, también conocido como ácido neoclorogénico por ser un isómero del ácido clorogénico, es un compuesto con alta capacidad antioxidante, especialmente frente a la peroxidación lipídica [187-189]. Además, es el compuesto mayoritario en extractos naturales de diferentes fuentes, y suele ser considerado uno de los principales responsables de la actividad antioxidante determinada en los extractos, siendo especialmente importante en el café [187, 190].

A su vez, el compuesto multinósido A ha mostrado actividad antioxidante frente a radicales libres generados por el DPPH, con un valor de concentración de inhibición del 50% (IC<sub>50</sub>) de 54,3 µg/mL. Además, presenta la capacidad de inhibir la producción del óxido nítrico con un valor de IC<sub>50</sub> de 43,9 µg/mL [191].

Por último, los dímeros y trímeros de procianidina han mostrado la capacidad de reducir el estrés oxidativo, modulando la actividad antioxidante enzimática mediante la regulación de la vía de síntesis del glutatión y mediante la inhibición de radicales libres generados por ABTS y DPPH (con valores de IC<sub>50</sub> entre 290 y 1.040 µg/mL en función

del procesamiento y del disolvente utilizado) [192, 193]. Esta actividad antioxidante es incluso superior a la mostrada por la catequina, tal y como observaron Mizuno *et al.*, ya que obtuvieron una actividad antioxidante con la procianidina B3 casi cuatro veces superior a la catequina [194].

Todo esto sugiere que la catequina y sus dos derivados presentes en el extracto P85, los ácidos fenólicos, especialmente el ácido 5-*O*-cafeoilquínico, así como las procianidinas, son los principales responsables de la alta actividad antioxidante observada en este extracto.

### **3. El extracto P85 muestra una inducción de la síntesis de melanina**

El extracto P85 aumentó la melanogénesis casi en un 300% en la línea celular murina de melanoma B16-F10. Este efecto se relaciona con un aumento de la capacidad de defensa frente a la radiación ultravioleta, ya que la producción de melanina es el sistema de defensa primario frente a la radiación solar.

Esta actividad melanogénica tan elevada del extracto P85 se debe a la alta concentración de polifenoles identificados en este extracto, ya que varios extractos vegetales con alto contenido fenólico han mostrado la capacidad de inducir la melanogénesis [51, 195].

Al igual que sucede con la actividad antioxidante, la actividad melanogénica del extracto P85 se podría relacionar con los compuestos mayoritarios del extracto. El ácido neoclorogénico o ácido 5-*O*-cafeoilquínico es el segundo compuesto mayoritario en el extracto P85. Li *et al.* estudiaron el efecto del ácido clorogénico sobre la melanogénesis

en la línea celular B16-F10 e hipotizaron que el ácido clorogénico actúa como sustrato de alguna enzima de la vía melanogénica, pudiendo actuar como un regulador, induciendo la melanogénesis a bajas concentraciones e inhibiéndola a altas concentraciones o con tratamientos más duraderos [196]. Además, otros autores han demostrado que el ácido isoclorogénico A muestra una actividad de inducción de melanogénesis mediante el aumento de la actividad de las principales enzimas de la vía melanogénica [197].

Por lo tanto, los datos encontrados en la bibliografía sugieren que el efecto melanogénico que tiene el extracto P85 podría deberse principalmente al ácido fenólico ácido 5-*O*-cafeoilquínico, además de otros compuestos minoritarios, tanto pertenecientes al grupo de ácidos fenólicos como a los flavonoides u otros compuestos polares. De hecho, la presencia de un número tan elevado de compuestos potencialmente bioactivos favorece la interacción entre diferentes compuestos, que podría ser una interacción sinérgica. De esta forma, se obtendría un efecto positivo elevado, a pesar de que las concentraciones sean bajas.

#### **4. El efecto fotoprotector del extracto P85 se podría deber principalmente a un efecto pantalla y a su capacidad antioxidante**

Por último, el extracto P85 presentó un efecto fotoprotector frente a la radiación UVA y UVB. Se irradió la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT en presencia y en ausencia del extracto P85 y se determinó el estrés oxidativo y la viabilidad celular. El tratamiento con el extracto P85 disminuyó el estrés oxidativo inducido por la

radiación UVA y UVB y, además, produjo un aumento de la viabilidad en las células tratadas con el extracto e irradiadas con UVB.

Esto muestra que el extracto P85 es efectivo para proteger frente a la radiación UVA y UVB, y que su protección podría deberse a su capacidad antioxidante. Este efecto antioxidante se produciría intracelularmente tras el incremento del estrés oxidativo que genera la radiación UV. Los compuestos polifenólicos tienen varios mecanismos antioxidantes, entre los que se incluyen la transferencia de electrón o de protón a los radicales libres, por lo que pueden reducir a los compuestos oxidantes generados intracelularmente y evitar el daño por el aumento del estrés oxidativo.

Sin embargo, dado el corto tiempo de tratamiento, la reducción del estrés oxidativo y de la toxicidad producida por la radiación UV que produjo el extracto P85 se pudo deber, en mayor medida, a un efecto pantalla, ya que la radiación con ambos UV se aplicó en presencia del extracto. Diversos extractos de plantas han sido estudiados por su potencial actividad fotoprotectora en formulaciones de protectores solares [198, 199]. Además, los polifenoles son capaces de absorber o bloquear la radiación UV debido a sus anillos aromáticos, que absorben la radiación UVA y UVB, ya que absorben especialmente en el rango de 200-400 nm. Dentro de los polifenoles, los flavonoides son la clase más conocida con propiedades fotoprotectoras, siendo la quercetina y la rutina (ambas presentes en el extracto P85) los compuestos más estudiados [90].

El uso de principios activos que presenten una actividad antioxidante o de reparación del daño del material genético, entre otros efectos beneficiosos, son un valor

añadido adicional. Tal es el caso de los polifenoles del té verde, que protegen del daño en el material genético y la inmunosupresión inducidos por la radiación UV, principalmente debido a su actividad antioxidante. También lo es el extracto de *Baccharis antioquensis*, que tiene capacidad fotoprotectora y presenta, además, actividad antioxidante. Estas actividades implican un efecto beneficioso añadido al que aporta directamente el efecto pantalla de los extractos, que también puede implicar una reducción del daño oxidativo, daño en el material genético e inmunosupresión que provoca la radiación UV [50, 200, 201].

El efecto protector del extracto P85, como se ha comentado anteriormente, podría deberse a sus compuestos principales. En el caso de las catequinas, su efecto fotoprotector se asocia a su capacidad de inhibir radicales libres, ya que no absorben efectivamente la radiación UVB [165, 202]. Además, el ácido clorogénico, que es un isómero del segundo compuesto mayoritario del extracto P85, ha mostrado una alta capacidad de filtrar la radiación UVA y UVB [203]. Por lo tanto, la catequina, que es el compuesto mayoritario del extracto P85, podría ser el principal responsable de la posible reducción de radicales libres que podría causar el extracto tras la radiación ultravioleta, además de otros compuestos con efecto antioxidante, mientras que el efecto pantalla sería el mecanismo principal de fotoprotección y se podría deber a los demás polifenoles, principalmente el ácido neoclorogénico.

Además de la fotoprotección debida al efecto pantalla y antioxidante del extracto P85, se debe tener en cuenta el efecto melanogénico del extracto, ya que la producción de melanina es el principal sistema endógeno de defensa contra la radiación ultravioleta.

Por lo tanto, todas las actividades determinadas en este estudio muestran que el extracto de piel de aguacate seleccionado por los sucesivos cribados, P85, es un potencial candidato para ser utilizado como un principio activo en un producto de protección solar. Sin embargo, serían necesarios más ensayos para establecer, en primer lugar, el mecanismo de acción del extracto, además de la actividad del ingrediente en una formulación para ser utilizada en nuevos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

## **CONCLUSIONES**





1. Los extractos de rabo de cereza están compuestos por terpenos, derivados de ácidos grasos, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, flavonoides y derivados. Esta composición cambia en función del método de extracción utilizado. El extracto scSWE presenta una mayor concentración de los ácidos orgánicos, fenólicos y derivados, el extracto scPLE de flavonoides y terpenos y el extracto scSFE tiene la mayor concentración de derivados de ácidos grasos. Además, los flavonoides principales en el extracto scSFE pertenecen a la familia de las crisinas, naringeninas y catequinas.
2. Los extractos scPLE y scSFE muestran un alto contenido polifenólico y capacidad antioxidante determinada mediante tres ensayos distintos, por lo que fueron seleccionados en el primer cribado. Tras el segundo cribado, el extracto scSFE fue seleccionado como candidato por presentar una actividad antioxidante muy similar al extracto scPLE y porque el método de extracción SFE está más industrializado que la extracción PLE. En ensayos posteriores, el extracto scSFE ha mostrado la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica y a los radicales hidroxilo y óxido nítrico.
3. El extracto scSFE presenta la capacidad de inhibir algunos procesos enzimáticos relacionados con el envejecimiento de la piel. Esta actividad de inhibición se relaciona con la prevención de la degradación de la matriz extracelular, con el mantenimiento de la piel y el antienvjecimiento celular.
4. Además, el extracto scSFE presenta un efecto fotoprotector frente a la radiación ultravioleta en un modelo celular de queratinocitos humanos. Este extracto

inhibe la toxicidad producida por la radiación UVB, así como reduce la generación de radicales libres inducida por la radiación UVA y UVB en un modelo celular. Esta fotoprotección podría deberse a la absorción de la radiación UV por los compuestos presentes en el extracto, a la inhibición de radicales libres o a otras actividades intracelulares.

5. Las diferentes actividades obtenidas con el tratamiento con el extracto scSFE muestran que es un candidato para ser utilizado como principio activo en un producto dermocosmético, especialmente enfocado en el cuidado de la piel frente al envejecimiento provocado por el estrés oxidativo.
6. Por otra parte, los extractos de piel y semilla de aguacate obtenidos por la técnica PLE están compuestos por flavonoides, ácidos fenólicos y derivados de alcoholes fenólicos, ácidos orgánicos y otros compuestos polares. Los compuestos mayoritarios obtenidos en los extractos de piel de aguacate son los flavonoides, mientras que los extractos de semilla de aguacate presentan una mayor concentración de ácidos fenólicos, derivados de alcoholes fenólicos y otros compuestos polares.
7. El extracto P85 es el más activo de los 6 extractos de aguacate estudiados, por lo que fue seleccionado como candidato tras varios cribados. Este extracto muestra un alto contenido fenólico y actividad antioxidante, determinado mediante diversos ensayos. Esta actividad antioxidante incluye la inhibición de la peroxidación lipídica y de diferentes radicales libres.

8. El extracto P85 induce la melanogénesis a concentraciones muy bajas, obteniendo una producción de melanina superior al control positivo utilizado y sin producir toxicidad en un modelo celular murino de melanoma. Además, este extracto muestra la inhibición del estrés oxidativo y mortalidad inducidos tras la radiación con UVA y UVB, debido probablemente tanto a un efecto pantalla como a la inhibición directa de radicales libres.
9. Todas las actividades mostradas por el extracto P85 sugieren que es un buen candidato para ser considerado como principio activo en un producto dermocosmético, especialmente enfocado a protectores solares.
10. Es necesario el desarrollo de nuevos ensayos, tanto con el extracto P85 como el extracto scSFE, para establecer el mecanismo de acción mediante el cual ejercen su actividad, para posteriormente ser introducidos en formulaciones, llevar a cabo ensayos *in vivo* y poder ser comercializados como nuevos productos dermocosméticos.



## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Zaldívar Notario, I., *Tendencias en innovación en la industria cosmética*, in *Industria cosmética*. 2019. p. 52-53.
2. Europe, C. *Cosmetics Industry*. [29/12/20]; Available from: <https://cosmeticseurope.eu/cosmetics-industry/>.
3. Baumann, L., *Botanical ingredients in cosmeceuticals*. *J Drugs Dermatol*, 2007. **6**(11): p. 1084-8.
4. Stanpa. 2020 09/07/20]; Available from: <https://www.stanpa.com/sector-en-cifras/sector-cosmetico-espana/>.
5. Commission, E. 2020 [09/07/20]; Available from: [https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics\\_en](https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics_en).
6. Colipa. *Eropean Cosmetics Association*. 2020 [09/07/20]; Available from: <https://colipa.eu/european-cosmetics-association/>.
7. Commission, E., *List of National Competent Authorities for Cosmetics, Poison Centres and other relevant authorities*. 2020.
8. Europe, C. 21/01/21]; Available from: <https://cosmeticseurope.eu/about-us/>.
9. Commission, E. *Cosmetic ingredient database*. [21/09/20]; Available from: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm>.
10. OECD. *OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring*. [19/11/20]; Available from: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>.
11. ENAC. *Buenas prácticas de laboratorio (BPL)*. Available from: [https://www.enac.es/web/enac/que-hacemos/otros-servicios/buenas-practicas-de-laboratorio-bpl-?p\\_p\\_id=MensajeCookie\\_WAR\\_Gestionportlet&p\\_p\\_lifecycle=1&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&MensajeCookie\\_WAR\\_Gestionportlet\\_javax.portlet.action=aceptarTodas](https://www.enac.es/web/enac/que-hacemos/otros-servicios/buenas-practicas-de-laboratorio-bpl-?p_p_id=MensajeCookie_WAR_Gestionportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&MensajeCookie_WAR_Gestionportlet_javax.portlet.action=aceptarTodas).
12. Almeida, A., B. Sarmento, and F. Rodrigues, *Insights on in vitro models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients*. *Int J Pharm*, 2017. **519**(1-2): p. 178-185.
13. Draelos, Z.D., *The cosmeceutical realm*. *Clin Dermatol*, 2008. **26**(6): p. 627-32.
14. Martin, K.I. and D.A. Glaser, *Cosmeceuticals: the new medicine of beauty*. *Mo Med*, 2011. **108**(1): p. 60-3.
15. Gao, X.H., et al., *Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals*. *Clin Dermatol*, 2008. **26**(4): p. 367-74.
16. Levin, J. and S.B. Momin, *How much do we really know about our favorite cosmeceutical ingredients?* *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 2010. **3**(2): p. 22-41.
17. Rivers, J.K., *The role of cosmeceuticals in antiaging therapy*. *Skin Therapy Lett*, 2008. **13**(8): p. 5-9.
18. Forni, M.F., M. Trombetta-Lima, and M.C. Sogayar, *Stem cells in embryonic skin development*. *Biol Res*, 2012. **45**(3): p. 215-22.
19. Pullar, J.M., A.C. Carr, and M.C.M. Vissers, *The Roles of Vitamin C in Skin Health*, in *Nutrients*. 2017.

20. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(2): p. 231-41.
21. Shindo, Y., et al., *Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(1): p. 122-4.
22. Kolarsick, P.A.J., M.A. Kolarsick, and C. Goodwin, *Anatomy and Physiology of the Skin*. Journal of the Dermatology Nurses' Association, 2011. **3**(4): p. 203-213.
23. Menon, G.K., *New insights into skin structure: scratching the surface*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54 Suppl 1**: p. S3-17.
24. Ito, S., K. Wakamatsu, and H. Ozeki, *Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis*. Pigment Cell Res, 2000. **13 Suppl 8**: p. 103-9.
25. Vincensi, M.R., et al., *Phaeomelanin versus eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects at high risk for melanoma: a pilot study*. Melanoma Res, 1998. **8**(1): p. 53-8.
26. Slominski, A., et al., *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1155-228.
27. Slominski, A., R. Paus, and D. Schadendorf, *Melanocytes as "sensory" and regulatory cells in the epidermis*. J Theor Biol, 1993. **164**(1): p. 103-20.
28. Kalka, K., et al., *Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2000. **13**(3-4): p. 143-9.
29. Mackintosh, J.A., *The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin*. J Theor Biol, 2001. **211**(2): p. 101-13.
30. Meyskens, F.L., Jr., P. Farmer, and J.P. Fruehauf, *Redox regulation in human melanocytes and melanoma*. Pigment Cell Res, 2001. **14**(3): p. 148-54.
31. Double, K.L., et al., *Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra*. Neurotoxicol Teratol, 2002. **24**(5): p. 621-8.
32. Wang, A., et al., *Photoprotection by porcine eumelanin against singlet oxygen production*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(3): p. 679-82.
33. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
34. McLafferty, E., *The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin*. Nurs Stand, 2012. **27**(3): p. 35-42.
35. Perez-Sanchez, A., et al., *Nutraceuticals for Skin Care: A Comprehensive Review of Human Clinical Studies*. Nutrients, 2018. **10**(4).
36. Haydont, V., B.A. Bernard, and N.O. Fortunel, *Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics*. Mech Ageing Dev, 2018.
37. Ricard-Blum, S., *The collagen family*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(1): p. a004978.
38. Aziz, J., et al., *Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin*. Skin Pharmacol Physiol, 2016. **29**(4): p. 190-203.



39. Mithieux, S.M. and A.S. Weiss, *Elastin*. Adv Protein Chem, 2005. **70**: p. 437-61.
40. Cui, Y., et al., *Rejuvenation of Aged Human Skin by Injection of Cross-linked Hyaluronic Acid*. Plast Reconstr Surg, 2021. **147**(1S-2): p. 43S-49S.
41. Pigeon, H., *Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model*. Pathol Biol (Paris), 2010. **58**(3): p. 226-31.
42. Van Doren, S.R., *Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 224-31.
43. Weihermann, A.C., et al., *Elastin structure and its involvement in skin photoageing*. Int J Cosmet Sci, 2017. **39**(3): p. 241-247.
44. Zhang, S. and E. Duan, *Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside*. Cell Transplant, 2018. **27**(5): p. 729-738.
45. Damiani, E. and S.E. Ullrich, *Understanding the connection between platelet-activating factor, a UV-induced lipid mediator of inflammation, immune suppression and skin cancer*. Prog Lipid Res, 2016. **63**: p. 14-27.
46. D'Orazio, J., et al., *UV Radiation and the Skin*, in *Int J Mol Sci*. 2013. p. 12222-48.
47. Hsu, W.L., et al., *Derinat Protects Skin against Ultraviolet-B (UVB)-Induced Cellular Damage*. Molecules, 2015. **20**(11): p. 20297-311.
48. Runger, T.M., *Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1999. **15**(6): p. 212-6.
49. Baccarin, T., et al., *Photoprotection by Punica granatum seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line*. J Photochem Photobiol B, 2015. **153**: p. 127-36.
50. Nichols, J.A. and S.K. Katiyar, *Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms*. Arch Dermatol Res, 2010. **302**(2): p. 71-83.
51. Perez-Sanchez, A., et al., *Lemon balm extract (Melissa officinalis, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model*. J Dermatol Sci, 2016. **84**(2): p. 169-177.
52. Qian, W., et al., *Natural skin-whitening compounds for the treatment of melanogenesis (Review)*. Exp Ther Med, 2020. **20**(1): p. 173-185.
53. Sample, A. and Y.Y. He, *Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2018. **34**(1): p. 13-24.
54. D'Mello, S.A., et al., *Signaling Pathways in Melanogenesis*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).
55. Skotarczak, K., et al., *Photoprotection: facts and controversies*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(1): p. 98-112.
56. Masaki, H., *Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects*. J Dermatol Sci, 2010. **58**(2): p. 85-90.
57. L. Agulló-Chazarra, A.P.-S., M. Herranz-López, and a.E.B.-C. V. Micol, *Chapter 31: UV Exposure and Skin Protective Effects of Plant Polyphenols. A*

- Handbook of Environmental Toxicology: Human Disorders and Ecotoxicology*. Vol. CAB International 2020. 2020.
58. Silva, S., B. Michniak-Kohn, and G.R. Leonardi, *An overview about oxidation in clinical practice of skin aging*. *An Bras Dermatol*, 2017. **92**(3): p. 367-374.
  59. Nicco, C. and F. Batteux, *ROS Modulator Molecules with Therapeutic Potential in Cancers Treatments*. *Molecules*, 2017. **23**(1).
  60. Harwansh, R.K., et al., *Enhancement of photoprotection potential of catechin loaded nanoemulsion gel against UVA induced oxidative stress*. *J Photochem Photobiol B*, 2016. **160**: p. 318-29.
  61. Feichtinger, R.G., et al., *Mitochondrial dysfunction: a neglected component of skin diseases*. *Exp Dermatol*, 2014. **23**(9): p. 607-14.
  62. Chaverri, J., N. Cardenas, and Y. Chirino, *El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno. Aspectos básicos e importancia biológica*. *Educación Química*, 2018. **17**: p. 443.
  63. Bouayed, J. and T. Bohn, *Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2010. **3**(4): p. 228-237.
  64. Stiefel, C. and W. Schwack, *Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects*. *Int J Cosmet Sci*, 2015. **37**(1): p. 2-30.
  65. Solano, F., *Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources*. *Molecules*, 2020. **25**(7).
  66. Gabros, S., T.A. Nessel, and P.M. Zito, *Sunscreens And Photoprotection*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
  67. Schroeder, P. and J. Krutmann, *What is needed for a sunscreen to provide complete protection*. *Skin Therapy Lett*, 2010. **15**(4): p. 4-5.
  68. Schulz, J., et al., *Distribution of sunscreens on skin*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. **54 Suppl 1**: p. S157-63.
  69. Lorigo, M., M. Mariana, and E. Cairrao, *Photoprotection of ultraviolet-B filters: Updated review of endocrine disrupting properties*. *Steroids*, 2018. **131**: p. 46-58.
  70. Cohen, L.E. and R.T. Grant, *Sun Protection: Current Management Strategies Addressing UV Exposure*. *Clin Plast Surg*, 2016. **43**(3): p. 605-10.
  71. Egambaram, O.P., S. Kesavan Pillai, and S.S. Ray, *Materials Science Challenges in Skin UV Protection: A Review*. *Photochem Photobiol*, 2020. **96**(4): p. 779-797.
  72. Singer, S., S. Karrer, and M. Berneburg, *Modern sun protection*. *Curr Opin Pharmacol*, 2019. **46**: p. 24-28.
  73. Sondenheimer, K. and J. Krutmann, *Novel Means for Photoprotection*. *Front Med (Lausanne)*, 2018. **5**: p. 162.
  74. Schneider, S.L. and H.W. Lim, *Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients*. *J Am Acad Dermatol*, 2019. **80**(1): p. 266-271.

75. Peschel, W., et al., *An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes*. Vol. 97. 2006. 137-150.
76. Banerjee, J., et al., *Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals*. Food Chem, 2017. **225**: p. 10-22.
77. Sinmisola, A., B.M. Oluwasesan, and A.P. Chukwuemeka, *Blighia sapida K.D. Koenig: A review on its phytochemistry, pharmacological and nutritional properties*. J Ethnopharmacol, 2019. **235**: p. 446-459.
78. Aizat, W.M., et al., *Recent updates on metabolite composition and medicinal benefits of mangosteen plant*. PeerJ, 2019. **7**: p. e6324.
79. Barbieri, R., et al., *Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity*. Microbiol Res, 2017. **196**: p. 44-68.
80. Ververidis, F., et al., *Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health*. Biotechnol J, 2007. **2**(10): p. 1214-34.
81. Zeiger, L.T.a.E., *Secondary Metabolites and Plant Defense. En: Plant Physiology*. Fourth Edition ed, ed. I. Sinauer Associates. 2006.
82. Losada-Echeberria, M., et al., *Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures*. Antioxidants (Basel), 2017. **6**(4).
83. Potapovich, A.I., et al., *Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFkappaB and AhR and EGFR-ERK pathway*. Toxicol Appl Pharmacol, 2011. **255**(2): p. 138-49.
84. Higdon, J.V. and B. Frei, *Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003. **43**(1): p. 89-143.
85. Peluso, I. and M. Serafini, *Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(11): p. 1195-1208.
86. Dvorakova, M. and P. Landa, *Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review*. Pharmacol Res, 2017. **124**: p. 126-145.
87. Xia, N., et al., *Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(12): p. 1633-1646.
88. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*, in *Oxid Med Cell Longev*. 2009. p. 270-8.
89. Zillich, O.V., et al., *Polyphenols as active ingredients for cosmetic products*. Int J Cosmet Sci, 2015. **37**(5): p. 455-64.
90. Cefali, L.C., et al., *Plant-based active photoprotectants for sunscreens*. Int J Cosmet Sci, 2016. **38**(4): p. 346-53.
91. Frombaum, M., et al., *Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and \*NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases*. Biochimie, 2012. **94**(2): p. 269-76.
92. Chaher, N., et al., *Bioactive stilbenes from Vitis vinifera grapevine shoots extracts*. J Sci Food Agric, 2014. **94**(5): p. 951-4.
93. Peng, R.M., et al., *Oral delivery system enhanced the bioavailability of stilbenes: resveratrol and pterostilbene*. Biofactors, 2018.

94. Budić-Leto, I. and T. Lovrić, *Identification of Phenolic Acids and Changes in their Content during Fermentation and Ageing of White Wines Pošip and Rukatac*. Food Technol. Biotechnol., 2002. **40**(3): p. 5.
95. Gutierrez-Grijalva, E.P., et al., *Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits*. Plants (Basel), 2017. **7**(1).
96. Wu, Y.H., et al., *Structure Properties and Mechanisms of Action of Naturally Originated Phenolic Acids and Their Derivatives against Human Viral Infections*. Curr Med Chem, 2017. **24**(38): p. 4279-4302.
97. Umezawa, T., *Diversity in lignan biosynthesis*. Phytochemistry Reviews, 2003. **2**(3): p. 371-390.
98. Ezzat, S.M., et al., *Anticancer potentiality of lignan rich fraction of six Flaxseed cultivars*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 544.
99. Murata, J., et al., *Oxidative rearrangement of (+)-sesamin by CYP92B14 co-generates twin dietary lignans in sesame*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 2155.
100. Frank, A. and M. Groll, *The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids*. Chem Rev, 2017. **117**(8): p. 5675-5703.
101. Tholl, D., *Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2015. **148**: p. 63-106.
102. Christmann, M., *Otto Wallach: founder of terpene chemistry and Nobel Laureate 1910*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(50): p. 9580-6.
103. Halla, N., et al., *Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies*. Molecules, 2018. **23**(7).
104. Ando, H., et al., *Linoleic acid and alpha-linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin*. Arch Dermatol Res, 1998. **290**(7): p. 375-81.
105. Pilkington, S.M., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: photoprotective macronutrients*. Exp Dermatol, 2011. **20**(7): p. 537-43.
106. Kim, H.H., et al., *Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo*. J Lipid Res, 2006. **47**(5): p. 921-30.
107. Ilievska, B., et al., *Topical Formulation Comprising Fatty Acid Extract from Cod Liver Oil: Development, Evaluation and Stability Studies*. Mar Drugs, 2016. **14**(6).
108. Goncalves, A.C., et al., *Antioxidant Status, Antidiabetic Properties and Effects on Caco-2 Cells of Colored and Non-Colored Enriched Extracts of Sweet Cherry Fruits*. Nutrients, 2018. **10**(11).
109. Serradilla, M.J., et al., *Authentication of "Cereza del Jerte" sweet cherry varieties by free zone capillary electrophoresis (FZCE)*. Food Chem, 2008. **111**(2): p. 457-61.
110. Acero, N., et al., *Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (Prunus avium L.) varieties*. Food Chem, 2019. **279**: p. 260-271.
111. Pacifico, S., et al., *Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of autochthonous Prunus avium cultivars from Campania Region*. Food Res Int, 2014. **64**: p. 188-199.

112. Bastos, C., et al., *Chemical characterisation and bioactive properties of Prunus avium L.: the widely studied fruits and the unexplored stems*. Food Chem, 2015. **173**: p. 1045-53.
113. Martini, S., A. Conte, and D. Tagliazucchi, *Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (Prunus avium) cultivars*. Food Res Int, 2017. **97**: p. 15-26.
114. Jesus, F., et al., *Exploring the phenolic profile, antioxidant, antidiabetic and anti-hemolytic potential of Prunus avium vegetal parts*. Food Res Int, 2019. **116**: p. 600-610.
115. Nastic, N., et al., *New technological approaches for recovering bioactive food constituents from sweet cherry (Prunus avium L.) stems*. Phytochem Anal, 2020. **31**(1): p. 119-130.
116. Yasir, M., S. Das, and M.D. Kharya, *The phytochemical and pharmacological profile of Persea americana Mill*. Pharmacogn Rev, 2010. **4**(7): p. 77-84.
117. Bhuyan, D.J., et al., *The Odyssey of Bioactive Compounds in Avocado (Persea americana) and Their Health Benefits*. Antioxidants (Basel), 2019. **8**(10).
118. Rodriguez-Carpena, J.G., D. Morcuende, and M. Estevez, *Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage*. Meat Sci, 2011. **89**(2): p. 166-73.
119. Gomez, F.S., et al., *Avocado Seeds: Extraction Optimization and Possible Use as Antioxidant in Food*. Antioxidants (Basel), 2014. **3**(2): p. 439-54.
120. Lu, Y.C., et al., *Secondary metabolites from the unripe pulp of Persea americana and their antimycobacterial activities*. Food Chem, 2012. **135**(4): p. 2904-9.
121. Adikaram, N.K.B., et al., *Antifungal compounds from immature avocado fruit peel*. Phytochemistry, 1992. **31**(1): p. 93-96.
122. Barrajon-Catalan, E., et al., *Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells*. Food Chem Toxicol, 2010. **48**(8-9): p. 2273-82.
123. Nobile, V., et al., *Skin photoprotective and antiageing effects of a combination of rosemary (Rosmarinus officinalis) and grapefruit (Citrus paradisi) polyphenols*. Food Nutr Res, 2016. **60**: p. 31871.
124. Švarc-Gajić, J., et al., *Bioactive compounds of sweet and sour cherry stems obtained by subcritical water extraction*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2018. **93**(6): p. 1627-1635.
125. Perez-Sanchez, A., et al., *Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers*. J Photochem Photobiol B, 2014. **136**: p. 12-8.
126. Pandey, M.M., et al., *Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of Tephrosia purpurea: a seasonal study*. J Integr Med, 2016. **14**(6): p. 447-455.
127. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(6): p. 1841-56.

128. Sanchez-Marzo, N., et al., *Antioxidant and Photoprotective Activity of Apigenin and its Potassium Salt Derivative in Human Keratinocytes and Absorption in Caco-2 Cell Monolayers*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(9).
129. Fernandez-Arroyo, S., et al., *Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from Hibiscus sabdariffa in rats and associated antioxidant status*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(10): p. 1590-5.
130. Cao, G., H.M. Alessio, and R.G. Cutler, *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. Free Radic Biol Med, 1993. **14**(3): p. 303-11.
131. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(5): p. 749-60.
132. Alam, M.N., N.J. Bristi, and M. Rafiquzzaman, *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*. Saudi Pharm J, 2013. **21**(2): p. 143-52.
133. Silva, I.K. and P. Soysa, *Evaluation of phytochemical composition and antioxidant capacity of a decoction containing Adenanthera pavonina L. and Thespesia populnea L*. Pharmacogn Mag, 2011. **7**(27): p. 193-9.
134. Roy, A., et al., *In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations*. Pharmacogn Rev, 2013. **7**(14): p. 97-106.
135. Zhao, C.N., et al., *Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of 30 Tea Infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark Teas*. Antioxidants (Basel), 2019. **8**(7).
136. Rosero, J.C., et al., *Analysis of Phenolic Composition of Byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (Persea americana Mill.) Cultivated in Colombia*. Molecules, 2019. **24**(17).
137. Ou, B., et al., *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(11): p. 3122-8.
138. Umeno, A., et al., *Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones*. Molecules, 2016. **21**(6).
139. He, M.T., et al., *Protective effect of Cordyceps militaris against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in vitro*. Nutr Res Pract, 2019. **13**(4): p. 279-285.
140. Bors, W., et al., *Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 343-55.
141. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. J Nutr Biochem, 2002. **13**(10): p. 572-584.
142. Sichel, G., et al., *In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub>-(.)*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 1-8.
143. Gonzalez-Burgos, E. and M.P. Gomez-Serranillos, *Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity*. Curr Med Chem, 2012. **19**(31): p. 5319-41.

144. Luo, Y., et al., *Evaluation of Fatty Acid Composition and Antioxidant Activity of Wild-Growing Mushrooms from Southwest China*. Int J Med Mushrooms, 2017. **19**(10): p. 937-947.
145. Salehi, B., et al., *The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials*. Pharmaceuticals (Basel), 2019. **12**(1).
146. Rashmi, R., et al., *Antioxidant Potential of Naringenin Helps to Protect Liver Tissue from Streptozotocin-Induced Damage*. Rep Biochem Mol Biol, 2018. **7**(1): p. 76-84.
147. Grzesik, M., et al., *Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants*. Food Chem, 2018. **241**: p. 480-492.
148. Koch, W., W. Kukula-Koch, and K. Glowniak, *Catechin Composition and Antioxidant Activity of Black Teas in Relation to Brewing Time*. J AOAC Int, 2017. **100**(6): p. 1694-1699.
149. Mani, R. and V. Natesan, *Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action*. Phytochemistry, 2018. **145**: p. 187-196.
150. Niu, Q., Y. Gao, and P. Liu, *Optimization of microwave-assisted extraction, antioxidant capacity, and characterization of total flavonoids from the leaves of *Alpinia oxyphylla* Miq.* Prep Biochem Biotechnol, 2019: p. 1-9.
151. Thring, T.S., P. Hili, and D.P. Naughton, *Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants*. BMC Complement Altern Med, 2009. **9**: p. 27.
152. Burlando, B., et al., *The bioactivity of *Hedysarum coronarium* extracts on skin enzymes and cells correlates with phenolic content*. Pharm Biol, 2017. **55**(1): p. 1984-1991.
153. Chatatikun, M. and A. Chiabchalard, *Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity*. BMC Complement Altern Med, 2017. **17**(1): p. 487.
154. Hartmann, A., et al., *Inhibition of Collagenase by Mycosporine-like Amino Acids from Marine Sources*. Planta Med, 2015. **81**(10): p. 813-20.
155. Vostalova, J., et al., *Skin Protective Activity of Silymarin and its Flavonolignans*. Molecules, 2019. **24**(6).
156. Tundis, R., et al., *Potential role of natural compounds against skin aging*. Curr Med Chem, 2015. **22**(12): p. 1515-38.
157. Baiao, D.D.S., et al., *Polyphenols from Root, Tubercles and Grains Cropped in Brazil: Chemical and Nutritional Characterization and Their Effects on Human Health and Diseases*. Nutrients, 2017. **9**(9).
158. Binic, I., et al., *Skin ageing: natural weapons and strategies*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 827248.
159. Dzialo, M., et al., *The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(2): p. 160.
160. Zaluski, D., et al., *LC-ESI-MS/MS profiling of phenolics from *Eleutherococcus* spp. inflorescences, structure-activity relationship as antioxidants, inhibitors of hyaluronidase and acetylcholinesterase*. Saudi Pharm J, 2017. **25**(5): p. 734-743.

161. Ochocka, R., et al., *The effect of mangiferin on skin: Penetration, permeation and inhibition of ECM enzymes*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0181542.
162. Eun Lee, K., et al., *Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using in silico and in vitro approach*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019. **34**(1): p. 927-936.
163. Zolghadri, S., et al., *A comprehensive review on tyrosinase inhibitors*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019. **34**(1): p. 279-309.
164. Pedrosa, T.D., et al., *Anti-wrinkle and anti-whitening effects of juca (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts*. Arch Dermatol Res, 2016. **308**(9): p. 643-654.
165. Kostyuk, V., et al., *Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics*. Rejuvenation Res, 2018. **21**(2): p. 91-101.
166. Almeida, I.F., et al., *Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line*. J Photochem Photobiol B, 2015. **144**: p. 28-34.
167. Moreira, L.C., et al., *In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC. (*Myrtaceae*): Prospects for developing a new dermocosmetic product*. Toxicol In Vitro, 2017. **45**(Pt 3): p. 397-408.
168. Wu, N.L., et al., *Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA- and UVB-induced damage*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(15): p. 8391-400.
169. El-Mahdy, M.A., et al., *Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(2): p. 307-16.
170. Cavinato, M., et al., *Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging*. Biogerontology, 2017. **18**(4): p. 499-516.
171. Magcwebeba, T., et al., *Anti-Inflammatory Effects of *Aspalathus linearis* and *Cyclopia* spp. Extracts in a UVB/Keratinocyte (HaCaT) Model Utilising Interleukin-1alpha Accumulation as Biomarker*. Molecules, 2016. **21**(10).
172. Wu, P.Y., et al., *Alleviation of Ultraviolet B-Induced Photodamage by *Coffea arabica* Extract in Human Skin Fibroblasts and Hairless Mouse Skin*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
173. Kim, E., et al., *Skin Protective Effect of Epigallocatechin Gallate*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
174. Singh, B.N., S. Shankar, and R.K. Srivastava, *Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(12): p. 1807-21.
175. Jeon, S.E., et al., *Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2003. **19**(5): p. 235-41.
176. Hu, Y., et al., *Protective Effect of Cyanidin-3-O-Glucoside against Ultraviolet B Radiation-Induced Cell Damage in Human HaCaT Keratinocytes*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 301.



177. Santos Sánchez, N., et al., *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*. 2019.
178. Saavedra, J., et al., *Industrial avocado waste: Functional compounds preservation by convective drying process*. Journal of Food Engineering, 2017. **198**: p. 81-90.
179. Rodríguez-Carpena, J.G., et al., *Avocado (Persea americana Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(10): p. 5625-35.
180. Ortega-Arellano, H.F., M. Jimenez-Del-Rio, and C. Velez-Pardo, *Neuroprotective Effects of Methanolic Extract of Avocado Persea americana (var. Colín) Peel on Paraquat-Induced Locomotor Impairment, Lipid Peroxidation and Shortage of Life Span in Transgenic knockdown Parkin Drosophila melanogaster*. Neurochem Res, 2019. **44**(8): p. 1986-1998.
181. Segovia, F.J., et al., *Avocado Seed: A Comparative Study of Antioxidant Content and Capacity in Protecting Oil Models from Oxidation*. Molecules, 2018. **23**(10).
182. Permal, R., et al., *Converting industrial organic waste from the cold-pressed avocado oil production line into a potential food preservative*. Food Chem, 2020. **306**: p. 125635.
183. Calderón-Oliver, M., et al., *Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts*. LWT - Food Science and Technology, 2016. **65**: p. 46-52.
184. Wang, W., T.R. Bostic, and L. Gu, *Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars*. Food Chemistry, 2010. **122**(4): p. 1193-1198.
185. Tremocoldi, M.A., et al., *Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0192577.
186. Oboh, G., et al., *Aqueous extracts of avocado pear (Persea americana Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities in vitro*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2016. **27**(2): p. 131-40.
187. Stefanello, N., et al., *Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system*. Food Chem Toxicol, 2019. **123**: p. 298-313.
188. Naveed, M., et al., *Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research*. Biomed Pharmacother, 2018. **97**: p. 67-74.
189. Santana-Galvez, J., L. Cisneros-Zevallos, and D.A. Jacobo-Velazquez, *Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome*. Molecules, 2017. **22**(3).
190. Tajik, N., et al., *The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature*. Eur J Nutr, 2017. **56**(7): p. 2215-2244.
191. Kim, S.K., et al., *Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-2) production of flavonoids from seeds of Prunus tomentosa Thunberg*. Arch Pharm Res, 2008. **31**(4): p. 424-8.

192. Liu, Z. and L. Yang, *Antisolvent precipitation for the preparation of high polymeric procyanidin nanoparticles under ultrasonication and evaluation of their antioxidant activity in vitro*. *Ultrason Sonochem*, 2018. **43**: p. 208-218.
193. Puiggros, F., et al., *Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(15): p. 6080-6.
194. Mizuno, M., et al., *Synthesis and antioxidant activity of a procyanidin B3 analogue*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017. **27**(4): p. 1041-1044.
195. Wang, J.Y., et al., *Network pharmacological mechanisms of Vernonia anthelmintica (L.) in the treatment of vitiligo: Isorhamnetin induction of melanogenesis via up-regulation of melanin-biosynthetic genes*. *BMC Syst Biol*, 2017. **11**(1): p. 103.
196. Li, H.R., et al., *Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells*. *Molecules*, 2014. **19**(9): p. 12940-8.
197. Mamat, N., et al., *Isochlorogenic acid A promotes melanin synthesis in B16 cell through the beta-catenin signal pathway*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017. **49**(9): p. 800-807.
198. Baldisserotto, A., et al., *Moringa oleifera Leaf Extracts as Multifunctional Ingredients for "Natural and Organic" Sunscreens and Photoprotective Preparations*. *Molecules*, 2018. **23**(3).
199. Yusuf, N., et al., *Photoprotective effects of green tea polyphenols*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2007. **23**(1): p. 48-56.
200. Matsui, M.S., et al., *Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2009. **14**(1): p. 56-9.
201. Mejia-Giraldo, J.C., et al., *Photoprotective Potential of Baccharis antioquiensis (Asteraceae) as Natural Sunscreen*. *Photochem Photobiol*, 2016. **92**(5): p. 742-52.
202. Bae, J., et al., *Activity of catechins and their applications*. *Biomedical Dermatology*, 2020. **4**(1): p. 8.
203. Choquet, B., et al., *Flavonoids and polyphenols, molecular families with sunscreen potential: determining effectiveness with an in vitro method*. *Nat Prod Commun*, 2009. **4**(2): p. 227-30.

**ANEXO: Artículos científicos de la Tesis Doctoral**



# 31 UV Exposure and Skin Protective Effects of Plant Polyphenols

L. Agulló-Chazarra<sup>a</sup>, A. Pérez-Sánchez<sup>a</sup>, M. Herranz-López<sup>a</sup>,  
V. Micol<sup>a,b</sup>, and E. Barrajón-Catalán<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain; <sup>b</sup>CIBER, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III (CB12/03/30038), Spain

## 31.1 Abstract

Skin exposure to ultraviolet (UV) radiation triggers a plethora of harmful effects, including skin cancer. UV radiation is linked to DNA damage, inflammation, oxidative stress, immunodepression, photoageing and extracellular matrix degradation. In this context, UV protection has emerged as a global concern not only for cosmetic purposes but also with clinical relevance. Industrial and scientific communities have tried to address this problem using different molecules for sunscreens that act as physical barriers. Despite these advances, major progress is still needed to find effective photoprotective formulations.

Natural compounds, especially plant polyphenols, suppose an almost limitless source of bioactive compounds with a variety of beneficial effects. Polyphenols have shown the capacity to alleviate most of the harmful effects of UV radiation in skin cells models. However, *in vivo* evidence for such activity is still scarce. Further, knowledge of the metabolites responsible for this photoprotective activity is very limited. This chapter reviews the most relevant results on the use of selected polyphenols to reverse the consequences of UV radiation on skin, focusing on

their main molecular targets and their putative molecular mechanism.

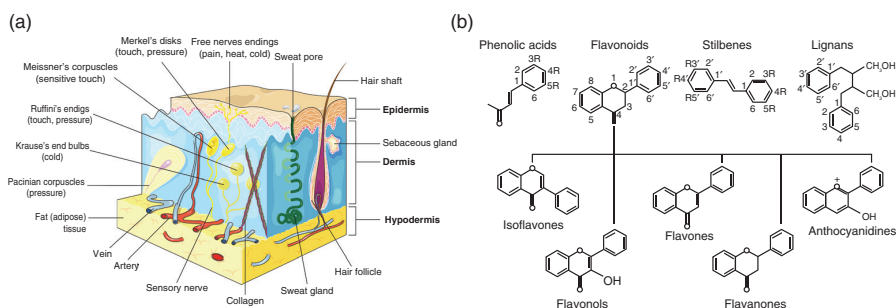
## 31.2 Introduction

### 31.2.1 Skin definition, function and structure

The skin is the largest organ in the body, with a surface area of 2 m<sup>2</sup> and a thickness between 0.5 mm and 4 mm, and it is the organism's first barrier. Its primary function is to act as a permeability barrier, preventing excessive loss of water from the body. The skin also has a protective role against external aggressions such as infections caused by microorganisms, chemical, mechanical or thermal agents and solar radiation (Shindo *et al.*, 1994a; Madison, 2003; Forni *et al.*, 2012; Pullar *et al.*, 2017). Furthermore, the skin is a sensitive organ, as the nerve endings and receptors related to the sense of touch and temperature are located within the skin.

Three layers form the skin: (i) epidermis; (ii) dermis; and (iii) hypodermis (Forni *et al.*, 2012) (Fig. 31.1a). Each of them presents different cell populations, structures and functions as described below.

<sup>1</sup> E-mail address: e.barrajon@umh.es



**Fig. 31.1.** (a) Human skin anatomy. There are three types of mechanoreceptors: tactile, proprioceptors and baroreceptors. Tactile mechanoreceptors are divided into Merkel's disks, Meissner's corpuscles, Ruffini's endings and Pacinian corpuscles. Another type of mechanoreceptor, Krause's end bulbs, is located in specialized regions to detect cold. Free nerve endings detect hot and cold, light touch and painful stimuli. This figure has been created and previously used by the author in Perez-Sanchez *et al.* (2018) using Servier Medical Art, licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License ([www.creativecommons.org/licenses/by/3.0/](http://www.creativecommons.org/licenses/by/3.0/)). (b) Main classes of polyphenols by structural classification. This image has been created and previously used by the author in Losada-Echeberria *et al.* (2017) and is under Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 31.2.1.1 Epidermis

The epidermis is the layer that remains in the external portion of the integumentary system. It is composed mainly of keratinocytes but also melanocytes, Langerhans cells, Merkel cells and sensorial receptors. In addition, the epidermis contains four different sub-layers: (i) *stratum basale*; (ii) *stratum spinosum*; (iii) *stratum granulosum*; and (iv) *stratum corneum* (Shindo *et al.*, 1994a; Menon, 2002; Madison, 2003; Kolarsick *et al.*, 2011).

Skin renovation takes place in the *stratum basale*, where the adhesion of the epidermis to the dermis is also located. This sub-layer includes melanocytes and keratinocytes. The former cells produce melanin, a pigment that protects the skin from UV radiation injuries. Melanin exists in two main chemical forms: (i) eumelanin, a dark pigment expressed mainly in the skin of pigmented individuals, which is much more efficient at blocking UV photons than (ii) pheomelanin, a light-coloured sulfated form resulting from incorporation of cysteines into melanin precursors (Vincenzi *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2000). Besides this UV protective function, melanin has other important physiological effects, including hormonal regulation, epidermal homeostasis, antioxidant activity and antimicrobial effects (Slominski *et al.*, 1993, Kalka *et al.*,

2000; Mackintosh, 2001; Meyskens *et al.*, 2001; Double *et al.*, 2002; Slominski *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Melanosomes are membrane-bound organelles for synthesis, storage and transport of melanin, which is then transferred from melanocytes to surrounding keratinocytes. The contact between the dendritic processes of differentiated melanocytes and keratinocytes is necessary for the melanin transfer into keratinocytes, determining skin colour (Van Den Bossche *et al.*, 2006; Cichorek *et al.*, 2013.). On the other hand, keratinocytes are the most common cells in the epidermis. They start their differentiation in this layer, before migrating into the *stratum spinosum*.

In the *stratum spinosum*, keratinocytes lose their proliferative activity and begin to participate in the assembly of the cornified envelope. Langerhans cells (antigen-presenting immune cells) also remain in this layer, participating in the immune response against microorganisms.

Keratinocytes form the *stratum granulosum*. In this stratum, keratinocytes begin to die through apoptosis. Cells lose their nucleus and organelles and keratinization begins. The cells in this layer are full of keratin, a protein synthesized by them that participates in protection against heat, chemicals and microorganisms and prevents dehydration (Nestle *et al.*, 2009; McLafferty, 2012).

Finally, the *stratum corneum* is the most external layer of the skin and therefore it is exposed to the external environment. This stratum is composed of dead keratinocytes, which protect against mechanical and dehydration injuries and avoid invasion by external substances such as microbes. This layer is the place where the desquamation and outward progression of the cells is produced (McLafferty, 2012).

### 31.2.1.2 Dermis

The dermis lies between the hypodermis and the epidermis and its primary function is to sustain and support the epidermis. The dermis is formed by two layers of connective tissue: the papillary stratum and the reticular stratum. The papillary stratum is a thin layer rich in reticulin fibres and capillaries that provide nutrients to the outer layers in the dermis. The reticular stratum presents numerous collagen and elastin fibres, forming the extracellular matrix (ECM) and providing structural support and stress-resistance to the skin. It contains cutaneous annexes (sweat and sebaceous glands and hair follicles) and numerous capillaries and sensory terminations. The dermis also contains abundant immune cells and fibroblasts (the major cell type present in this layer) (Perez-Sanchez *et al.*, 2018), which are mainly responsible for ECM synthesis. This wide diversity of structures and cells of the dermal matrix is increased by the existence of heterogeneities associated with skin fibroblasts (Haydont *et al.*, 2018).

### 31.2.1.3 Hypodermis

The hypodermis or subcutaneous tissue is the deepest layer of the skin. It mainly comprises connective and adipose tissues and participates in temperature isolation, gives protective padding and acts as an energy storage area. Its thickness is variable, depending on age, body part and physical condition; however, it can constitute up to 15–30% of body weight.

## 31.2.2 Ultraviolet radiation and the skin

The chronic exposure of the skin to UV radiation is the essential factor that initiates several skin disorders, such as inflammation, immunosuppression,

photoageing and skin cancer (Nichols and Katiyar, 2010; Baccarin *et al.*, 2015). This radiation induces DNA damage, can produce mutations of the *p53* gene, which promotes tumour growth, causes immunosuppression and increases oxidative stress. Besides its negative effects, UV radiation causes other important effects such as melanogenesis induction, and it is essential for vitamin D synthesis.

UV radiation can be subdivided into UVC, UVB and UVA categories based on electro-physical properties.

- **UVC radiation** (200–280 nm) presents the highest energy and the lowest penetration capacity of UV radiation (D’Orazio *et al.*, 2013). It is absorbed in the atmospheric ozone and usually does not reach the earth’s surface.
- **UVB radiation** (280–320 nm) represents 5% of the UV radiation that reaches the ground and is almost entirely absorbed by the epidermis. UVB is directly absorbed by DNA, causing molecular rearrangements and forming specific photoproducts such as cyclobutane dimers and 6-4 photoproducts. UVB is responsible for damage due to sunburn, it induces oxidative stress and acts as a genotoxic agent, resulting in the most cytotoxic and mutagenic radiation (D’Orazio *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2015).
- **UVA radiation** (320–400 nm) compresses the long-wave spectrum. It represents about 95% of the solar radiation that reaches the earth’s surface. UVA penetrates deeply into the epidermis, reaching well into the dermis and being responsible for photoageing. UVA can excite DNA directly, producing dimers of pyrimidine in skin cells and generating reactive oxygen species (ROS) (Runger, 1999; D’Orazio *et al.*, 2013).

## 31.2.3 Polyphenols

### 31.2.3.1 Overview

Polyphenols are secondary metabolites of plants that are involved in the protective response of the plant to different stress situations such as UV radiation and aggression by pathogens (bacteria, virus or fungus) (Pandey and Rizvi, 2009).

Polyphenols are natural compounds found mainly in fruits and berries, vegetables, oilseeds, cereals, tea and spices (Baiao *et al.*, 2017).

### 31.2.3.2 Structure and classification

A polyphenol is composed of one or more aromatic rings with one or more hydroxyl substitutions, including different functional moieties (Hossen *et al.*, 2017). The number and type of substitutions generate the different classes and subclasses of polyphenols, which leads to the structural variability that characterizes the group of polyphenols (Losada-Echeberria *et al.*, 2017). Glycosylation is also very common, increasing polyphenols in number and diversity. Polyphenols can be classified in different ways. However, the most extended classification divides them into (i) flavonoids; (ii) stilbenes; (iii) phenolic acids; and (iv) lignans (Ratz-Lyko *et al.*, 2015) (Fig. 31.1b).

#### 31.2.3.3 Flavonoids

Flavonoids comprise the most studied group of polyphenols and are synthesized via the phenylpropanoid metabolic pathway. They present characteristic C6-C3-C6 structures and a six-member oxygen heterocycle. They are divided into six subclasses: (i) flavones; (ii) flavonols; (iii) flavanones; (iv) flavanols; (v) isoflavones; and (vi) anthocyanidines (Pandey and Rizvi, 2009; Losada-Echeberria *et al.*, 2017). Flavonoids present potential antioxidant and anti-carcinogenic effects, among others (Zillich *et al.*, 2015; Cefali *et al.*, 2016).

#### 31.2.3.4 Stilbenes

Stilbenes are composed of polyphenols with two phenyl moieties connected by a two-carbon methylene bridge. Stilbenes present different biological properties, such as antioxidant activity and anti-ageing effects (Frombaum *et al.*, 2012; Chaher *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2018).

#### 31.2.3.5 Phenolic acids

Phenolic acids have usually esterified sugars or organic acids and are biosynthesized through the shikimic acid pathway. They can be divided into hydroxybenzoic acids, which have a C6-C1 structure and are derived from benzoic acid, and

hydroxycinnamic acids, derived from a cinnamic acid and with a C6-C3 structure (Budić-Leto and Lovrić, 2002). Phenolic acids present a potential antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer benefits and antiviral function (Gutierrez-Grijalva *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017b).

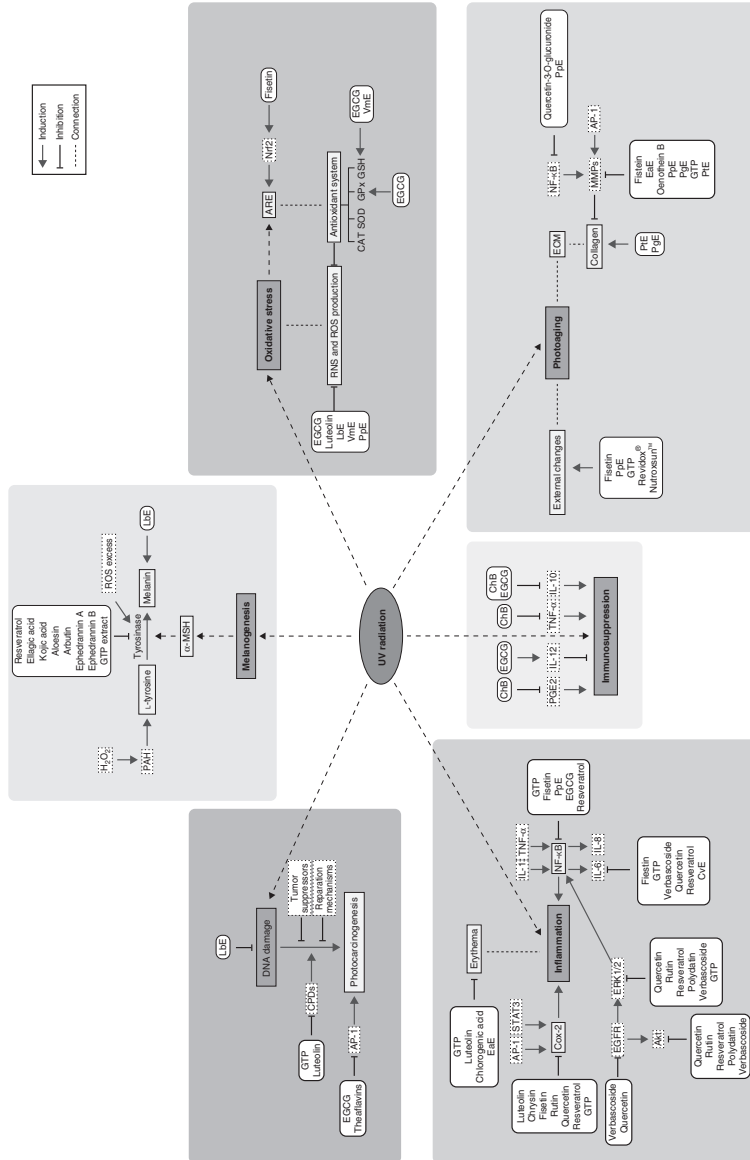
#### 31.2.3.6 Lignans

Lignans are (C6-C3) phenylpropanoid dimers (Umezawa, 2003). They show different biological activities. Some lignans can act as phytoestrogens and have reported potential anti-tumoral activity against breast cancer (Ezzat *et al.*, 2018). Furthermore, different lignans have shown action against Alzheimer's disease and a photoprotective effect against UV (Murata *et al.*, 2017).

## 31.3 Effects of Polyphenols on UV-induced Skin Damage

UV radiation can cause or aggravate several skin disorders related to DNA damage, oxidative stress, immunosuppression, inflammation and photoageing (Fig. 31.2). The organism presents different mechanisms of defence, such as melanogenesis, the immune response, mechanisms for DNA repairing and the endogenous antioxidant system. These defence mechanisms can be improved or protected with the oral or topical administration of natural molecules with skin-protective properties, such as vitamins or polyphenols. Most of the polyphenols are pigments that can absorb UV radiation and act as a sunscreen (Nichols and Katiyar, 2010). This sunscreen effect can reduce or avoid DNA damage, oxidative stress, immunosuppression, inflammation and photoageing effects of UV radiation in the skin. Furthermore, polyphenols present different chemical characteristics that give them the ability to reduce UV damage through different mechanisms of action, such as direct interaction with receptors, modulation of signal transduction and transcription of different genes, modulation of enzymatic activities and regulation of epigenetic gene expression (Potapovich *et al.*, 2011). All these mechanisms will be further reviewed in the following sections.





**Fig. 31.2.** Alterations of UV in skin and polyphenol interactions. UV radiation leads to DNA damage, melanogenesis, oxidative stress, photoaging, immunosuppression and inflammation. Some polyphenols or polyphenolic extracts can inhibit or reduce these UV-induced effects through different mechanisms. Inhibition or induction of various factors affected by polyphenols is represented in the figure. External changes include changes of the properties of the skin cells that are involved in photoaging, such as epidermal thickness, wrinkles and skin hyperplasia, cell death, skin elasticity and skin redness. Activation and inhibition relationships are shown using green (→) or red (←) symbols.

### 31.3.1 Polyphenols and DNA damage

UV radiation leads to DNA damage in skin cells through the generation of photo products such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) (Feehan and Shantz, 2016). UV radiation can also induce mutations of different genes, including tumour suppressor genes such as *p53* and oncogenes (Damiani and Ullrich, 2016). Furthermore, adjacent pyrimidine bases can change into dimeric photoproducts due to strand breaks, nucleic acid oxidation or photoreaction (Harwansh *et al.*, 2016). These alterations can initiate signalling pathways that can lead to cycle arrest and the activation of DNA repairing mechanisms (Fig. 31.2). If these mechanisms fail, UV radiation causes harmful effects such as the above-mentioned oxidative stress, immunosuppression, inflammation and photoageing, and may even initiate the carcinogenesis process.

UV-induced DNA damage can initiate photocarcinogenesis through induction of tumour promoters' induction, inhibition of tumour suppressor genes or avoiding the mechanisms of DNA repairing. One of the primary response mechanisms is related to UVB activation of activator protein-1 (AP-1), which is a tumour promoter (Barthelman *et al.*, 1998) (Fig. 31.2). The UVB induction of AP-1 and DNA damage are related to carcinogenesis, through the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (Lu *et al.*, 2016; Montes de Oca *et al.*, 2017).

Some polyphenols present different activities that protect from UV-induced DNA damage. A lemon balm extract (LbE) decreases the UVB-induced DNA damage and histone H2A (H2AX) activation. Pérez-Sánchez *et al.* (2016) studied the protective effect of LbE against UVB-induced DNA damage. The extract was mainly composed of rosmarinic acid and derivatives. They studied the presence of nuclear DNA damage through comet assay, which detects single-strand DNA breaks, alkali-labile sites and incomplete excision repair sites and DNA:DNA cross-linking. Also, they studied the effect of LbE in H2AX activation, observing that LbE decreased both the UVB-induced DNA damage and H2AX activation.

Other polyphenols, such as green tea polyphenols (GTP) and luteolin, protect from UV-

induced damage through the inhibition of CPD formation (Katiyar *et al.*, 2000; Meeran *et al.*, 2009; Wölflle *et al.*, 2011). Green tea is a traditional source of polyphenols, with numerous studies supporting its protective effects against cancer (Wang *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 2000; Katiyar *et al.* (2000) studied the protection of GTP against UVB-induced DNA damage in six Caucasian people. This GTP formulation contained epicatechin (6%), epigallocatechin (5%), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (65%) and epicatechin-3-gallate (24%). They observed that topical pretreatment with GTP (1 mg cm<sup>-2</sup> of skin area) inhibited UVB-induced CPD formation in epidermis and dermis. In addition, Meeran *et al.* (2009) studied the protective effect of the administration of GTP in drinking-water (0.2% w/v) against UVB damage using interleukin (IL)-12p40 knockout (IL-12-KO) mice. They showed that GTP-reduced levels of CPDs after UVB exposure in wild-type mice was more pronounced than in IL-12-KO mice, concluding that prevention of carcinogenesis by GTP is mediated through IL-12-dependent DNA repair. Finally, Wölflle *et al.* (2011) demonstrated that luteolin prevented CDP formation after UVB irradiation by absorbing UV radiation, as the reduction of CPD formation was apparent 1 h after irradiation, and before DNA repair mechanisms could occur.

Furthermore, it has been shown that polyphenols protect against photocarcinogenesis through their activity against DNA damage or through the inhibition of UV-induced tumour promoters. EGCG and theaflavins inhibit UVB-induced AP-1 activity (Barthelman *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2000). Barthelman *et al.* (1998) observed that EGCG inhibited UVB-induced AP-1 activity in a dose ranging from 5.45 nM to 54.5 µM in HCL14 human keratinocytes. Also, 60% inhibition of UVB-induced AP-1 by topical administration of 5 mg EGCG before and after irradiation was observed in B6D2 transgenic mice. Theaflavins are flavanol-derived polyphenols present in black tea. The major theaflavins in black tea are theaflavin, theaflavin-3-O-gallate, and theaflavin-3,3-O-digallate. Nomura *et al.* (2000) observed that treatment with theaflavins and EGCG before UVB radiation blocked UVB-induced AP-1 activity, and the theaflavin-3,3-O-digallate showed the strongest effect in a mouse epidermal cell line, JB6. Moreover, theaflavins inhibited UVB-induced phosphorylation of ERKs and

JNKs; meanwhile, EGCG inhibited only the ERK-dependent pathway.

### 31.3.2 Anti-inflammatory effects

Skin exposition to UV radiation causes an inflammatory process (Fig. 31.2), which is externally characterized by erythema or sunburn (Guan *et al.*, 2017). The erythema, which is mainly induced by UVB, is an acute inflammatory reaction of the skin that is identified by skin redness, pruritus and pain. It is characterized by an increase of blood flow that causes a dilation of the blood vessels in the dermis. This dilation is produced to increase blood supply to the damage site. In addition, the UV radiation induces changes in the microvascular skin structure to help the entrance of the plasma proteins and increases the migration of immune system cells through the endothelium (Feehan and Shantz, 2016).

On the one hand, UVB increases the cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in skin keratinocytes. The over-expression of both proteins is a marker of inflammation in the skin (Nichols and Katiyar, 2010). COX-2 catalyses the production of pro-inflammatory prostaglandin (PG) metabolites in the skin, which are produced from arachidonic acid. The expression of COX-2 and iNOS is regulated by several transcription factors such as AP-1 (which is also activated by UV radiation, as explained above) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) (Choi *et al.*, 2014). In addition, UVB induces the activation of MAPKs and causes the phosphorylation of ERK and p38 MAPK (Wölflle *et al.*, 2011).

On the other hand, UV radiation causes the translocation of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) into the nucleus. NF- $\kappa$ B is a transcription factor that is modulated by cytokines that induce the inflammatory process, such as IL-1 and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). NF- $\kappa$ B modulates IL-6 and IL-8, TNF- $\alpha$ , interferon gamma (IFN $\gamma$ ) and transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ) expression (Renard *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2017a). In addition, TGF- $\alpha$  induces the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor (EGFR), which is also activated by UV radiation leading to inflammatory responses (Potapovich *et al.*, 2011). Also, NF- $\kappa$ B activates

an immunosuppressive response and promotes ECM degradation through the activation of genes responsible for the production of matrix metalloproteinases (MMPs), especially involved in collagen degradation (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008).

Furthermore, polyphenols can reduce UVB-induced inflammation through different pathways, such as avoiding over-expression or activation of MAPK and COX-2. Luteolin, chrysin, fisetin, rutin, quercetin, resveratrol and GTP reduce UVB-induced COX-2 induction (Agarwal *et al.*, 1993; Meeran *et al.*, 2009; Wölflle *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011, 2017a; Potapovich *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2014). More details about these studies are given below.

The anti-inflammatory activity is the most visible effect of some polyphenols, since they can improve inflammatory markers such as oedema or erythema. GTP, luteolin, chlorogenic acid and an *Epilobium angustifolium* extract (EaE) inhibited UVB-induced erythema response (Katiyar *et al.*, 2000; Afaq *et al.*, 2003; Wölflle *et al.*, 2011; Kitagawa *et al.*, 2011; Ruzsova *et al.*, 2013). Katiyar *et al.* (2000) also observed that topical pretreatment with GTP (1 mg cm<sup>-2</sup> of skin area) inhibited UVB-induced erythema response in epidermis and dermis. In addition, Afaq *et al.* (2003) observed that topical application of GTP to SKH-1 hairless mice before UVB radiation inhibited UVB-induced skin oedema, hyperplasia and infiltration of leucocytes. Wölflle *et al.* (2011) observed the effect of luteolin *in vivo* using the UVB erythema test. Kitagawa *et al.* (2011) found that chlorogenic acid prevented UVB-induced erythema formation in guinea pigs. Finally, Ruzsova *et al.* (2013) observed that the EaE extract prevented UV-induced erythema formation *in vivo* on the skin of healthy human volunteers.

Wölflle *et al.* (2011) observed that luteolin at 16  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> before irradiation of 90 mJ cm<sup>-2</sup> UVB reduced the UVB-induced COX-2 expression through the attenuation of p38 MAPK and ERK activation in a human keratinocytes cell line, HaCaT. Wu *et al.* (2011) observed in HaCaT cell line that treatment with chrysin before UVA and UVB radiation inhibited the induction of COX-2. Chrysin also regulated the signalling of MAPK, inhibited JNK phosphorylation and attenuated p38 and ERK phosphorylation. Wu *et al.* (2017a) observed that fisetin reduced UVB-induced skin

inflammation through the inhibition of COX-2 expression in human keratinocytes. Choi *et al.* (2014) observed that the topical application of rutin, a glycone quercetin, before UVB radiation inhibited UVB-induced COX-2 expression in HR-1 mouse skin through inhibition of p38 MAPK and JNK phosphorylation. In addition, they observed that rutin inhibited UVB-induced iNOS expression, AP-1 DNA binding and the phosphorylation of STAT3. Potapovich *et al.* (2013) observed that quercetin and resveratrol reduced COX-2 expression. Finally, Agarwal *et al.* (1993) and Meeran *et al.* (2009) observed that GTP (0.2% w/v) in drinking-water reduced the levels of UVB-induced cyclooxygenase activities in mice.

In addition, polyphenols can reduce UVB-induced NF- $\kappa$ B activity or pro-inflammatory cytokines levels, such as TNF- $\alpha$  or IL-6. On the one hand, GTP, fisetin, quercetin, resveratrol, verbascoside and a *Calluna vulgaris* extract (CvE) reduced IL-6 (Afaq *et al.*, 2003; Meeran *et al.*, 2009; Olteanu *et al.*, 2012; Potapovich *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017a). On the other hand, GTP, fisetin, a pomegranate polyphenolic extract (PpE), EGCG and resveratrol reduced NF- $\kappa$ B activity (Wu *et al.*, 2017a; Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Adhami *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001).

Meeran *et al.* (2009) observed that GTP (0.2% w/v) in drinking-water reduced TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in UVB-exposed mice skin. In addition, GTP reduced PGE2 levels, a marker of inflammation. Furthermore, Afaq *et al.* (2003) observed that GTP inhibited the activation of NF- $\kappa$ B through inhibition of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) and the subsequent reduced degradation of I $\kappa$ B, leading to NF- $\kappa$ B retention in its inactive form in the cytoplasm. Wu *et al.* (2017a) observed that fisetin reduced UVB-induced skin inflammation through the inhibition of IL-6 and NF- $\kappa$ B in human keratinocytes. Potapovich *et al.* (2013) studied the anti-inflammatory effect of quercetin, resveratrol and verbascoside in normal human epidermal keratinocytes (NHEK) cell line. Pretreatment with quercetin and resveratrol and treatment after the UV radiation with quercetin and verbascoside reduced IL-6 expression. Verbascoside inhibited UV-induced IL-8 and TNF- $\alpha$  expression. In addition, quercetin, resveratrol and verbascoside inhibited the UV-induced production of IL-1. Olteanu *et al.* (2012) observed that CvE, which is enriched in quercetin and kaempferol, reduced IL-6 and TNF- $\alpha$  in SKH-1

hairless mice. Pacheco-Palencia *et al.* (2008) observed that PpE extract, composed of 37.5% of ellagitannins and approximately 2.7% of ellagic acid, inhibited UVA and UVB-induced activation of NF- $\kappa$ B. Adhami *et al.* (2003) and Kim *et al.* (2001) observed that EGCG and resveratrol inhibited UV-induced NF- $\kappa$ B gene expression.

Finally, polyphenols can reduce UVB-induced inflammation through another pathway. Afaq *et al.* (2003) observed that GTP inhibited inflammation through the reduction of ERK1/2 and JNK1/2 and p38 phosphorylation and JNK1/2 and p38 protein expressions. Potapovich *et al.* (2011) observed that verbascoside and quercetin inhibited EGFR phosphorylation in normal NHEK. In addition, they observed that quercetin, rutin, resveratrol, polydatin and verbascoside repressed UV-induced protein kinase B (Akt) phosphorylation, which is associated with EGFR activation, and inhibited ERK phosphorylation.

### 31.3.3 Oxidative stress and polyphenols

The exposition of the skin to UV radiation generates ROS. UV radiation produces superoxide, which results in hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide forms hydroxyl radicals through the Fenton reaction (Perez-Sanchez *et al.*, 2016). This increase in ROS can cause structural damages to lipids and proteins through peroxidation and oxidation, respectively. Furthermore, excessive oxidative stress leads to inflammation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, ageing and immunosuppression (Feichtinger *et al.*, 2014; Harwansh *et al.*, 2016).

However, ROS are necessary for the organism and are naturally produced during metabolic processes as the result of aerobic cellular metabolism. Intracellular ROS concentration is controlled by the antioxidant system, composed of enzymes and others antioxidant substances (Silva *et al.*, 2017). In this sense, the production and elimination of ROS present an equilibrium. If this equilibrium is broken, ROS excess leads to an oxidative stress condition, as happens in excessive UV radiation exposure, or it is not counterbalanced by intracellular antioxidant systems (Nicco and Batteux, 2017).

The antioxidant-response element (ARE) pathway is controlled by DNA sequences or

elements that regulate genes encoding for antioxidant proteins, such as haem oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione *S*-transferase (GST) (Jaiswal, 2004). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) binds to ARE to regulate the transcriptional activation of these antioxidant genes, and its inhibition by UV radiation causes oxidative stress damage (Wu *et al.*, 2017a). This regulation neutralizes oxidative stress and is a part of the intracellular antioxidant system. UV radiation also modifies the cellular antioxidant system, reducing catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase and glutathione peroxidase (GPx) levels and activity (Shindo *et al.*, 1994b; Harwansh *et al.*, 2016).

The antioxidant activity of polyphenols becomes very important as most of the UV radiation injuries, such as DNA damage, immunosuppression, inflammation and photoageing, are mediated/produced by oxidative stress. As a consequence of inhibition of oxidative stress by some polyphenols, protection against other UV radiation injuries takes place.

Polyphenols reduce antioxidant stress through different mechanisms, such as reducing the formation of oxidative molecules or increasing their elimination. EGCG reduces hydrogen peroxide and nitric oxide (NO) production (Katiyar *et al.*, 2001). In addition, luteolin and LbE reduced UVB-induced ROS formation, a *Vaccinium myrtillus* fruit extract (VmE) reduced UVA-induced ROS production and PpE reduced UVA and UVB-induced ROS formation (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Svobodova *et al.*, 2008; Wölfle *et al.*, 2011; Perez-Sanchez *et al.*, 2016). More details about these studies are given below.

Katiyar *et al.* (2001) observed that pretreatment with 1 mg cm<sup>-2</sup> of EGCG in the skin decreased UV-induced hydrogen peroxide production by 68–90% and NO production by 30–100% in dermis and epidermis in six people. In addition, EGCG inhibited the infiltration of inflammatory leucocytes into the skin, which is related to the production of ROS, and inhibited epidermal lipid peroxidation. Wölfle *et al.* (2011) observed that luteolin showed antioxidant activity in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay and decreased UVB-induced intracellular generation of ROS in HaCaT cells through 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) assay. In addition, they observed that luteolin reduces UVB-induced

oxidative stress and nitrate stress. Pérez-Sánchez *et al.* (2016) observed that LbE significantly decreased UVB-induced intracellular ROS production through DCF assay in HaCaT cells. Svobodová *et al.* (2008) observed that VmE reduced UVA-induced ROS formation in HaCaT keratinocytes. This antioxidant effect may be attributed to anthocyanins which account for 25% w/v, mainly cyanidin, delphinidin and their derivatives. Finally, Pacheco-Palencia *et al.* (2008) observed that treatment with PpE significantly reduced UVA- and UVB-induced ROS generation in SKU-1064 human skin fibroblasts through DCF assay. This extract contains 37.5% ellagitannins and 2.7% ellagic acid.

The antioxidant-mediated photoprotective activity of the main polyphenols in olive oil has also been studied (Salucci *et al.*, 2017). In this sense, hydroxytyrosol (HyT) is the main polyphenol in olive oil and presents a well characterized antioxidant activity (Hu *et al.*, 2014). Salucci *et al.* (2017) studied whether the different number and position of the phenolic hydroxyl groups altered the antioxidant effect of HyT and their influence on photoprotective activity. They compared the antioxidant effect of HyT, hydroxytyrosyl laurate (Laur-HyT) and hydroxytyrosyl myristate (Myr-HyT). Laur-HyT and Myr-HyT showed less photoprotective activity than HyT. However, they penetrated better than HyT through the human corneum stratum and viable epidermis membranes (Salucci *et al.*, 2017).

Furthermore, some polyphenols can improve the cellular antioxidant system. Katiyar *et al.* (2001) observed that EGCG restored glutathione (GSH) level and GPx activity and Svobodová *et al.* (2008) observed that VmE reduced the depletion of intracellular GSH.

Finally, polyphenols can reduce oxidative stress through pathways involved in the redox balance such as the *Nrf2* gene. Wu *et al.* (2017a) observed that the topical application of fisetin reduced UVB-induced oxidative stress by increasing *Nrf2* expression in BALB/c hairless mice.

### 31.3.4 Polyphenols and immunosuppression

The immune system (IS) and immune response are influenced by UV radiation. The main consequence

is a radiation-related immunosuppression, which is mediated by different mechanisms (Noonan and De Fabo, 1992; Streilein *et al.*, 1994). Langerhans cells are dendritic cells critical for the presentation of antigens to the immune system on the skin. These cells are mainly located in the epidermis and are responsible for T-lymphocyte activation through antigen presentation (Damiani and Ullrich, 2016). The alteration of Langerhans cells by UV leads to immunosuppression by the reduction of antigen presentation, and subsequent IS activation.

UV-induced immunosuppression is also modulated by various cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-12 (Fig. 31.2). UV radiation induces TNF- $\alpha$  and IL-10 expression, which are mediators of UVB-induced immunosuppression, and reduces IL-12 (Norval, 2006). TNF- $\alpha$  induces the migration of Langerhans cells to draining lymph nodes, where they lose their role in skin immunity. IL-10 is related to CPD formation (Moodycliffe *et al.*, 1994) and modulates the production of PGE<sub>2</sub>, which is an important mediator of UV-induced immunosuppression and sunburn response. IL-12 participates in the development of T helper 1 responses, inducing the production of interferon (IFN) from natural killer (NK) cells. Furthermore, IL-12 suppresses UV-induced TNF- $\alpha$  and IL-10 production and induces DNA repair through nucleotide excision repair (NER) mechanism (Hasegawa *et al.*, 2013).

UVB radiation directly affects DNA, causing DNA damage and inducing urocanic acid (UCA) isomerization from *trans* to *cis* form. This isomerization is related to the stimulation of mast cell degranulation. The UVB induction of TNF- $\alpha$  and IL-10, the level of *cis*-UCA and the prevalence of dermal mast cells are the potential susceptibility factors for UVB-induced immunosuppression (Hart *et al.*, 2001).

Polyphenols have demonstrated different effects that could be related to UV-induced immunosuppression (Fig. 31.2). The flavone chafuroside B (ChB), isolated from oolong tea leaves, inhibits IL-10, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> production and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) expression. They studied the effect of ChB against UVB-induced immunosuppression in NHEK cells and observed that ChB inhibited the production of immunosuppressive mediators as IL-10, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> and reduced the expression of RANKL, which is a member of the

TNF family that induces Langerhans cells to produce IL-10. Finally, they suggested that these effects of ChB could be mediated through the induction of IL-12 synthesis (Hasegawa *et al.*, 2013).

Other polyphenols have shown activity against UV-mediated immunosuppression. EGCG decreased IL-10 and increased IL-12 and GTP prevented suppression of local and systemic contact hypersensitivity (Katiyar *et al.*, 1999). Katiyar *et al.* (1999) observed that topical application of EGCG before UVB radiation prevented UVB-induced immunosuppression by decreasing IL-10 in the skin and in draining lymph nodes (DLN) and inducing IL-12 in DLN in C3H/HeN mice. In addition, EGCG reduced the infiltration of monocytes/macrophages and neutrophils into inflammatory skin lesions. Furthermore, Katiyar *et al.* (2010) observed that GTP, administered in drinking-water (0.2 and 0.5% w/v) to C3H/HeN mice, prevented UV-induced suppression of local and systemic contact hypersensitivity by 58–62% and 51–55%, respectively.

### 31.3.5 Photoageing

Photoageing is defined as the extrinsic aging caused by solar exposition. This is mainly due to UV radiation and it is characterized by wrinkles, dryness, loss of elasticity, mottled pigmentation and hyperkeratosis (Damiani and Ullrich, 2016). Extrinsic photoageing is mainly caused by UV radiation but can be synergically increased by pollution, chemicals and toxins. From a molecular point of view, photoageing is primarily related to the degradation of ECM proteins, such as collagen and elastic fibres, and a decreased rate of their renewal/synthesis as a consequence of exposure to UV radiation. These ECM components provide structural and functional support to the skin tissue. Collagen is the primary insoluble fibrous protein in ECM. It gives strength and elasticity to the skin. Collagen is synthesized by fibroblasts and degraded by MMPs, which are responsible for degrading the extracellular matrix proteins, not only collagen but also elastin, fibronectin and proteoglycans. UV radiation increases MMP expression, leading to ECM degradation and photoageing (Pittayapruerk *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2017). NF- $\kappa$ B and AP-1 are

factors involved in this UV-mediated MMP activation. Upon UV radiation, NF- $\kappa$ B up-regulates MMPs such as MMP-1 and MMP-3 in dermal fibroblasts and AP-1 increases the expression of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 (Pittayapruerk *et al.*, 2016) (Fig. 31.2).

Polyphenols are potential active ingredients against photoageing through pleiotropic mechanisms, including direct UV absorption, their antioxidant activity and interaction with different factors involved in photoageing such as NF- $\kappa$ B and AP-1 (Fig. 31.2). Also, polyphenols can improve the properties of the skin cells that are involved in photoageing, related to external changes. Fisetin improves epidermal thickness, wrinkles and skin hyperplasia (Wu *et al.*, 2017a); PpE decreases UVB-induced cell death (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008); GTPs decrease protein oxidation (Vayalil *et al.*, 2004); a grape and pomegranate dietary supplement improves skin elasticity, skin roughness, wrinkle depth and age spots (Buonocore *et al.*, 2012); and the nutraceutical Nutroxsun<sup>TM</sup>, improves wrinkle depth, skin elasticity, skin redness and lipoperoxides (Nobile *et al.*, 2016). More details about these studies are given below.

Wu *et al.* (2017a) reported that topical application of fisetin reduced UVB-induced epidermal thickness in female BALB/c hairless mice by 62%. In addition, fisetin reduced wrinkles and ameliorated skin hyperplasia. Pacheco-Palencia *et al.* (2008) study showed that the pomegranate extract (PpE) showed a protective activity against UV-induced cell death in SKU-1064 human skin fibroblasts. This inhibition was observed at concentrations as low as 20 mg l<sup>-1</sup> against UVB and 60 mg l<sup>-1</sup> against UVA. Vayalil *et al.* (2004) observed that 0.2% of GTP in water (w/v) decreased UVB-induced protein oxidation, a hallmark of photoageing, in female SKH-1 hairless mice and in human skin fibroblasts HS68 cells. Buonocore *et al.* (2012) observed that Revidox®, a dietary supplement that combines grape (*Vitis vinifera*) and pomegranate polyphenols, improved skin elasticity and diminished skin roughness, wrinkle depth and the intensity of age spots after 60 days of treatment in 50 healthy females and males. Nobile *et al.* (2016) observed that Nutroxsun<sup>TM</sup>, a nutraceutical product that contains citrus and rosemary extracts, improved UVB-induced skin redness, UVA-induced lipoperoxides, wrinkle depth and skin elasticity after 2 weeks of

treatment in 90 Caucasian women, using two different dose regimens (100 and 250 mg per day).

As mentioned above, photoageing is mainly related to the degradation of ECM proteins, and collagen is the primary insoluble fibrous protein in ECM, which is degraded by MMPs. Some polyphenols protect against photoageing through the inhibition of the degradation of ECM components, such as reducing the UV-induced MMP expression. Fisetin reduces MMP-1 and MMP-2 expression (Wu *et al.*, 2017a); EaE inhibits MMP-1 and MMP-3 expression and oenothien B, a polyphenol isolated from EaE, inhibits MMPs (Ruszova *et al.*, 2013); PpE reduces MMP-1 and MMP-13 expression (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008); another *Punica granatum* extract (PgE) reduces MMP-1 expression (Park *et al.*, 2010); GTP inhibits MMP-2, MMP-3, MMP-7 and MMP-9 expression (Vayali *et al.*, 2004); and a *Passiflora tarminiana* extract (PtE) reduces MMP-1 production (Bravo *et al.*, 2017). In addition, EaE decreases Hyal-2 hyaluronidase expression (Ruszova *et al.*, 2013), quercetin-3-O-glucuronide and PpE inhibit the activation of NF- $\kappa$ B (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008), and PgE and PtE increase procollagen, by inhibiting collagenase (Bravo *et al.*, 2017) as observed in *in vitro* experiments. Further details are given below.

Wu *et al.* (2017a) observed that topical application of fisetin reduced UVB-induced MMP-1 and MMP-2 expression in female BALB/c hairless mice. Ruszova *et al.* (2013) observed that EaE suppressed UV-induced MMP-1 and MMP-3 expression. Furthermore, EaE decreased UV-induced Hyal-2 expression, a weak acid-active hyaluronidase partly responsible for the degradation of hyaluronan, one of the major ECM components in the skin. In addition, oenothien B, a polyphenol isolated from EaE, inhibited MMPs and quercetin-3-O-glucuronide inhibited RANKL. Pacheco-Palencia *et al.* (2008) reported that the treatment with concentrations of PpE higher than 10 mg l<sup>-1</sup> decreased the UVB-induced MMP-1 and MMP-13 expression and inhibited UV-induced activation of NF- $\kappa$ B in SKU-1064 human skin fibroblasts. Park *et al.* (2010) studied the protective effect of PgE against UVB radiation in normal human dermal fibroblasts obtained from a skin biopsy. They compared the effect of PgE with the effect of catechin, which was the main polyphenol present

in that PgE. Cells treated with PgE following UVB radiation showed more concentration of procollagen type I. In addition, post-treatment with PgE inhibited UVB-induced MMP-1 expression. Although these effects may be related to catechin, its effect was lower than the effect of the whole extract. Vayalil *et al.* (2004) observed that 0.2% of GTP in water (w/v) inhibited UVB-induced expression of MMP-2 (67%), MMP-3 (63%), MMP-7 (62%) and MMP-9 (60%) in female SKH-1 hairless mice skin. Finally, Bravo *et al.* (2017) studied the anti-photoageing effect of PtE extract containing procyanidins and glycosylated flavonoids. Both whole PtE and its fractions reduced photoageing hallmarks in human dermal fibroblasts from adult skin (HDFa). They reported that the entire extract and its fractions decreased UVB-induced MMP-1 production and increased UVB-inhibited procollagen production.

### 31.3.6 Melanin induction by polyphenols

Melanin production is probably the main endogenous defence against UV radiation. Melanin absorbs UV radiation and reduces the formation of photoproducts that could be harmful to the skin (Sample and He, 2018). As explained in previous sections, melanin is produced by melanocytes, present in the epidermis. They produce melanin and transfer it to keratinocytes that migrate to external layers of the skin. UV radiation increases melanin production in different ways. The former is through  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), which is induced upon UV radiation (Masaki, 2010). The second is the oxidative stress mediated by UV exposition, which is characterized by a ROS excess that leads to an increase of tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 activities, which are melanogenic factors. In this regard, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) generated by UV radiation activates epidermal phenylalanine hydroxylase (PH), an enzyme that produces L-tyrosine, the main substrate of tyrosinase, from L-phenylalanine. However, a huge ROS excess can also present the contrary effect, enhancing depigmentation and causing depigmented macules in the skin as occurs in vitiligo.

Polyphenols have been reported as enhancing and reducing melanin production activities,

depending on the study and individual polyphenol. The former activity increases UV protection and can be useful to avoid depigmentation, but the second also has interesting implications, especially cosmetic as whitening agents for the skin. Kojic acid, aloesin, arbutin and resveratrol inhibit tyrosinase activity (Mishima *et al.*, 1988; Garcia and Fulton, 1996; Maeda and Fukuda, 1996; Jones *et al.*, 2002); ellagic acid (EA) inhibits tyrosinase activity and melanin content (Shimogaki *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004); ephedranin A and B decrease tyrosinase transcription (Kim *et al.*, 2015); a GTP extract inhibits tyrosinase (Wei *et al.*, 2009); and LbE increases melanogenesis (Perez-Sanchez *et al.*, 2016). Additional details on each study are provided below.

Mishima *et al.* (1988) examined the effect of 1–3 mM kojic acid in B16 cells. They observed that kojic acid reduced the pigmentation and tyrosinase activity. In addition, Garcia and Fulton (1996) studied the effect of different formulations containing hydroquinone, kojic acid and glycolic acid in 39 subjects with melasma, finding a pigmentation reduction in the subjects. Similar results in tyrosinase activity and melanin production were obtained by Maeda and Fukuda (1996) with arbutin, a 3-D-glucopyranoside of hydroquinone, when using human melanocytes obtained from Asian neonatal foreskins. They observed that arbutin inhibited melanin production and tyrosinase activity acting as a competitive inhibitor of tyrosinase.

Jones *et al.* (2002) studied the effect of aloesin in comparison with arbutin and kojic acid. Using *in vitro* experiments, they observed that kojic acid presented the highest inhibition of fungal, human and murine tyrosinase, followed by aloesin and arbutin. Kim *et al.* (2004) also performed *in vitro* experiments, observing that resveratrol presented an inhibitory effect of tyrosinase of mushroom tyrosinase. Resveratrol inhibited 67 % of tyrosinase, showing an inhibitory concentration of 50% of the enzyme activity (IC<sub>50</sub>) of 43.5  $\mu$ M. Among other authors, Wei *et al.* (2009) have studied *in vitro* tyrosinase activity too. They evaluated this activity using a GTP extract containing 98.25% polyphenols, and the main group was catechins (81.83% of the total content). They observed that, within the range of 1–100 mg l<sup>-1</sup> of extract, the extract showed a tyrosinase inhibitory rate between



75.37% and 57.14%. These results suggest that this extract could be another candidate for whitening.

Shimogaki *et al.* (2000) reported that 4  $\mu\text{M}$  of EA inhibited tyrosinase activity and melanin content was inhibited by 38.3% and 54.4%, respectively, in B16 cells. In addition, they observed that treatment with 1% of EA inhibited UV-induced melanogenesis in brownish guinea pigs. Kim *et al.* (2015) observed that ephedranin A and B inhibited melanin production by decreasing tyrosinase transcription, using the same cellular model. In this case, ephedranin B showed a higher activity than A, but both could be candidates as whitening agents for skin.

On the contrary, Pérez-Sánchez *et al.* (2016) studied the melanogenic effect of LbE in B16 mouse melanoma cells. They observed that LbE increased melanogenesis by 40% at 100  $\text{mg ml}^{-1}$  compared with control, showing a protective effect against UV radiation.

### 31.4 Conclusions

Skin is a unique system of defence against the harmful effects of UV radiation. It is a very complex tissue with different layers and cell types from epithelial to immune origin. There is plenty of scientific evidence indicating the protective effects of plant polyphenols against UV damaging effects. Polyphenols are capable of inhibiting DNA damage (CPDs, oxidation or photoreaction), oxidative stress, inflammation, immunosuppression, ECM degradation and the activation of transcription factors involved in differentiation, proliferation and apoptosis. Among them, flavonols, catechins, theaflavins, phenylpropanoids and stilbenes have been shown to be the most promising candidate molecules. Although much information is available

on the topical use of these compounds, data on the efficacy of oral administration is scarce. Therefore, further studies are required to prove the efficacy of plant polyphenols properly.

Identification of the major metabolites responsible for skin protective effects against UV is still one of the major issues to be addressed. Plant polyphenols suffer important transformations both by microbiota in the large intestine and when absorbed by liver conjugation. Further, other transformations can take place when absorbed in target tissues such as the skin. Therefore, *in vivo* studies that correlate the presence of certain polyphenols in the skin cells and their UV-protective effects are needed to establish a mechanistic approach to their action. In addition to performing efficacy studies in skin cell models, well designed human trials with strong statistical power are needed to prove the efficacy of plant polyphenols. Therefore, although the existing evidence on the beneficial effects of plant polyphenols against UV damage is promising, much work is still required to promote these compounds as reliable active ingredients in topical or oral formulations for sun protection.

### Acknowledgements

This work was supported by projects AGL2011-29857-C03-02 and AGL2011-29857-C03-03 (Spanish Ministry of Science and Innovation); AGL2015-67995-C3-1-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO)); PROMETEO/2012/007, PROMETEO/2016/006, ACOMP/2013/093, ACIF/2013/064, APOTIP/2017/003 and APOSTD/2017/023 (Generalitat Valenciana), and CIBER (CB12/03/30038, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III, Spain).

### References

- Adhami, V.M., Afaq, F. and Ahmad, N. (2003) Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF- $\kappa$ B in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia* 5, 74–82.
- Afaq, F., Ahmad, N. and Mukhtar, H. (2003) Suppression of UVB-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B by green tea polyphenol in SKH-1 hairless mice. *Oncogene* 22, 9254–9264.
- Agarwal, R., Katiyar, S.K., Khan, S.G. and Mukhtar, H. (1993) Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. *Photochemistry and Photobiology* 58, 695–700.

- Baccarin, T., Mitjans, M., Ramos, D., Lemos-Senna, E. and Vinardell, M.P. (2015) Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology* 153, 127–136.
- Baiao, D.D.S., De Freitas, C.S., Gomes, L.P., Da Silva, D., Correa, A. *et al.* (2017) Polyphenols from root, tubercles and grains cropped in Brazil: chemical and nutritional characterization and their effects on human health and diseases. *Nutrients* 9, 1044.
- Barthelman, M., Bair, W.B. 3rd, Stickland, K.K., Chen, W., Timmermann, B.N. *et al.* (1998) (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity. *Carcinogenesis* 19, 2201–2204.
- Bravo, K., Duque, L., Ferreres, F., Moreno, D.A. and Osorio, E. (2017) *Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology* 168, 78–88.
- Budić-Leto, I. and Lovrić, T. (2002) Identification of phenolic acids and changes in their content during fermentation and ageing of white wines Pošip and Rukatac. *Food Technology and Biotechnology* 40, 5.
- Buonocore, D., Lazeretti, A., Tocabens, P., Nobile, V., Cestone, E. *et al.* (2012) Resveratrol-procyanidin blend: nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebocontrolled, double-blind study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 5, 159–165.
- Cefali, L.C., Ataide, J.A., Moriel, P., Foglio, M.A. and Mazzola, P.G. (2016) Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science* 38, 346–353.
- Chaher, N., Arraki, K., Dillinseger, E., Temsamani, H., Bernillon, S. *et al.* (2014) Bioactive stilbenes from *Vitis vinifera* grapevine shoots extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 951–954.
- Choi, K.S., Kundu, J.K., Chun, K.S., Na, H.K. and Surh, Y.J. (2014) Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 559, 38–45.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A. and Tymirńska, A. (2013) Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatologii Alergologii* 30, 30–41.
- Damiani, E. and Ullrich, S.E. (2016) Understanding the connection between platelet-activating factor, a UV-induced lipid mediator of inflammation, immune suppression and skin cancer. *Progress in Lipid Research* 63, 14–27.
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. and Scott, T. (2013) UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences* 14(6), 12222–12248
- Double, K.L., Ben-Shachar, D., Youdim, M.B., Zecca, L., Riederer, P. and Gerlach, M. (2002) Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicology and Teratology* 24, 621–628.
- Ezzat, S.M., Shouman, S.A., Elkhoely, A., Attia, Y.M., Elseyy, M.S. *et al.* (2018) Anticancer potentiality of lignan rich fraction of six Flaxseed cultivars. *Scientific Reports* 8, 544.
- Feehan, R.P. and Shantz, L.M. (2016) Molecular signaling cascades involved in nonmelanoma skin carcinogenesis. *Biochemistry Journal* 473, 2973–2994.
- Feichtinger, R.G., Sperl, W., Bauer, J.W. and Kofler, B. (2014) Mitochondrial dysfunction: a neglected component of skin diseases. *Experimental Dermatology* 23, 607–614.
- Forni, M.F., Trombetta-Lima, M. and Sogayar, M.C. (2012) Stem cells in embryonic skin development. *Biological Research* 45, 215–222.
- Frombaum, M., Le Clanche, S., Bonnefont-Rousselot, D. and Borderie, D. (2012) Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and \*NO bioavailability: potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie* 94, 269–276.
- Fu, Y.C., Jin, X.P., Wei, S.M., Lin, H.F. and Kacew, S. (2000) Ultraviolet radiation and reactive oxygen generation as inducers of keratinocyte apoptosis: protective role of tea polyphenols. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 61, 177–188.
- Garcia, A. and Fulton, J.E. Jr (1996) The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions. *Dermatologic Surgery* 22, 443–447.
- Guan, L., Suggs, A., Galan, E., Lam, M. and Baron, E.D. (2017) Topical application of ST266 reduces UV-induced skin damage. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 10, 459–471.
- Gutierrez-Grijalva, E.P., Picos-Salas, M.A., Leyva-Lopez, N., Criollo-Mendoza, M.S., Vazquez-Olivo, G. and Heredia, J.B. (2017) Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants (Basel)* 7, 2.
- Hart, P.H., Grimaldeston, M.A. and Finlay-Jones, J.J. (2001) Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28, 1–8.

- Harwansh, R.K., Mukherjee, P.K., Kar, A., Bahadur, S., Al-Dhabi, N.A. and Duraipandiyan, V. (2016) Enhancement of photoprotection potential of catechin loaded nanoemulsion gel against UVA induced oxidative stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology* 160, 318–329.
- Hasegawa, T., Shimada, S., Ishida, H. and Nakashima, M. (2013) Chafuroside B, an Oolong tea polyphenol, ameliorates UVB-induced DNA damage and generation of photo-immunosuppression related mediators in human keratinocytes. *PLoS ONE* 8, e77308.
- Haydont, V., Bernard, B.A. and Fortunel, N.O. (2018) Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mechanisms of Ageing and Development* 177, 150–156.
- Hossen, M.S., Ali, M.Y., Jahurul, M.H.A., Abdel-Daim, M.M., Gan, S.H. and Khalil, M.I. (2017) Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: a review. *Pharmacological Reports* 69, 1194–1205.
- Hsu, W.L., Lu, J.H., Noda, M., Wu, C.Y., Liu, J.D. et al. (2015) Derinat protects skin against ultraviolet-B (UVB)-induced cellular damage. *Molecules* 20, 20297–20311.
- Hu, T., He, X.W., Jiang, J.G. and Xu, X.L. (2014) Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 62, 1449–1455.
- Ito, S., Wakamatsu, K. and Ozeki, H. (2000) Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Research* 13 (Suppl. 8), 103–109.
- Jaiswal, A.K. (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radical Biology and Medicine* 36, 1199–1207.
- Jones, K., Hughes, J., Hong, M., Jia, Q. and Orndorff, S. (2002) Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Research* 15, 335–340.
- Kalka, K., Mukhtar, H., Turowski-Wanke, A. and Merk, H. (2000) Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 13, 143–149.
- Katiyar, S.K., Challa, A., McCormick, T.S., Cooper, K.D. and Mukhtar, H. (1999) Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis* 20, 2117–2124.
- Katiyar, S.K., Perez, A. and Mukhtar, H. (2000) Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. *Clinical Cancer Research* 6, 3864–3869.
- Katiyar, S.K., Afaq, F., Perez, A. and Mukhtar, H. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 22, 287–294.
- Katiyar, S.K., Vaid, M., Van Steeg, H. and Meeran, S.M. (2010) Green tea polyphenols prevent UV-induced immunosuppression by rapid repair of DNA damage and enhancement of nucleotide excision repair genes. *Cancer Prevention Research (Philadelphia)* 3, 179–189.
- Kim, J., Hwang, J.S., Cho, Y.K., Han, Y., Jeon, Y.J. and Yang, K.H. (2001) Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 14, 11–19.
- Kim, D.H., Kim, J.H., Baek, S.H., Seo, J.H., Kho, Y.H., Oh, T.K. and Lee, C.H. (2004) Enhancement of tyrosinase inhibition of the extract of *Veratrum patulum* using cellulase. *Biotechnology and Bioengineering* 87, 849–854.
- Kim, I.S., Yoon, S.J., Park, Y.J. and Lee, H.B. (2015) Inhibitory effect of ephedrannins A and B from roots of *Ephedra sinica* STAPF on melanogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850, 1389–1396.
- Kitagawa, S., Yoshii, K., Morita, S. Y. and Teraoka, R. (2011) Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. *Chemical and Pharmacological Bulletin (Tokyo)* 59, 793–796.
- Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A. and Goodwin, C. (2011) Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3, 203–213.
- Kong, S.Z., Li, D.D., Luo, H., Li, W.J., Huang, Y.M. et al. (2017) Anti-photoaging effects of chitosan oligosaccharide in ultraviolet-irradiated hairless mouse skin. *Experimental Gerontology* 103, 27–34.
- Losada-Echeberria, M., Herranz-Lopez, M., Micol, V. and Barrajon-Catalan, E. (2017) Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants (Basel)* 6, 88.
- Lu, J., Guo, J.H., Tu, X.L., Zhang, C., Zhao, M., Zhang, Q.W. and Gao, F.H. (2016) Tiron inhibits UVB-induced AP-1 binding sites transcriptional activation on MMP-1 and MMP-3 promoters by MAPK signaling pathway in human dermal fibroblasts. *PLoS ONE* 11, e0159998.
- Mackintosh, J.A. (2001) The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *Journal of Theoretical Biology* 211, 101–113.

- Madison, K.C. (2003) Barrier function of the skin: 'la raison d'etre' of the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 121, 231–241.
- Maeda, K. and Fukuda, M. (1996) Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 276, 765–769.
- Masaki, H. (2010) Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science* 58, 85–90.
- McLafferty, E. (2012) The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard* 27, 35–42.
- Meeran, S.M., Akhtar, S. and Katiyar, S.K. (2009) Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* 129, 1258–1270.
- Menon, G.K. (2002) New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (Suppl. 1), S3–17.
- Meyskens, F.L. Jr, Farmer, P. and Fruehauf, J.P. (2001) Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research* 14, 148–154.
- Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y. and Inazu, M. (1988) Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Research* 1, 367–374.
- Montes de Oca, M.K., Pearlman, R.L., McClees, S.F., Strickland, R. and Afaq, F. (2017) Phytochemicals for the prevention of photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology* 93, 956–974.
- Moodycliffe, A.M., Kimber, I. and Norval, M. (1994) Role of tumour necrosis factor- $\alpha$  in ultraviolet B light-induced dendritic cell migration and suppression of contact hypersensitivity. *Immunology* 81, 79–84.
- Murata, J., Ono, E., Yoroizuka, S., Toyonaga, H., Shiraishi, A. et al. (2017) Oxidative rearrangement of (+)-sesamin by CYP92B14 co-generates twin dietary lignans in sesame. *Nature Communications* 8, 2155.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z. and Nickoloff, B.J. (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews: Immunology* 9, 679–691.
- Nicco, C. and Batteux, F. (2017) ROS modulator molecules with therapeutic potential in cancers treatments. *Molecules* 23, E84.
- Nichols, J.A. and Katiyar, S.K. (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research* 302, 71–83.
- Nobile, V., Michelotti, A., Cestone, E., Caturla, N., Castillo, J. et al. (2016) Skin photoprotective and anti-ageing effects of a combination of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) polyphenols. *Food & Nutrition Research* 60, 31871.
- Nomura, M., Ma, W.Y., Huang, C., Yang, C.S., Bowden, G.T., Miyamoto, K. and Dong, Z. (2000) Inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activation by theaflavins from black tea. *Molecular Carcinogenesis* 28, 148–155.
- Noonan, F.P. and De Fabo, E.C. (1992) Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid. *Immunology Today* 13, 250–254.
- Norval, M. (2006) The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 92, 108–118.
- Olteanu, E. D., Filip, A., Clichici, S., Daicoviciu, D., Achim, M. et al. (2012) Photochemoprotective effect of *Calluna vulgaris* extract on skin exposed to multiple doses of ultraviolet B in SKH-1 hairless mice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 31, 233–243.
- Pacheco-Palencia, L.A., Noratto, G., Hingorani, L., Talcott, S.T. and Mertens-Talcott, S.U. (2008) Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8434–8441.
- Pandey, K.B. and Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 270–278.
- Park, H.M., Moon, E., Kim, A.J., Kim, M.H., Lee, S. et al. (2010) Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. *International Journal of Dermatology* 49, 276–282.
- Peng, R.M., Lin, G.R., Ting, Y. and Hu, J.Y. (2018) Oral delivery system enhanced the bioavailability of stilbenes: resveratrol and pterostilbene. *Biofactors* 44, 5–15.
- Perez-Sanchez, A., Barrajón-Catalán, E., Herranz-Lopez, M., Castillo, J. and Micol, V. (2016) Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents UVB-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. *Journal of Dermatological Science* 84, 169–177.
- Perez-Sanchez, A., Barrajón-Catalán, E., Herranz-Lopez, M. and Micol, V. (2018) Nutraceuticals for skin care: a comprehensive review of human clinical studies. *Nutrients* 10, 403.

- Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M. and Ohtsuki, M. (2016) Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 17.
- Potapovich, A.I., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, V.A., De Luca, C., Pastore, S. and Korkina, L.G. (2011) Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NF $\kappa$ B and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology* 255, 138–149.
- Potapovich, A.I., Kostyuk, V.A., Kostyuk, T.V., De Luca, C. and Korkina, L.G. (2013) Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research* 62, 773–780.
- Pullar, J.M., Carr, A.C. and Vissers, M.C.M. (2017) The roles of vitamin C in skin health. *Nutrients* 9, 866.
- Ratz-Lyko, A., Arct, J., Majewski, S. and Pytkowska, K. (2015) Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. *Phytotherapy Research* 29, 509–517.
- Renard, P., Zachary, M.D., Bougelet, C., Mirault, M.E., Haegeman, G., Remacle, J. and Raes, M. (1997) Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation. *Biochemical Pharmacology* 53, 149–160.
- Runger, T.M. (1999) Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 15, 212–216.
- Ruszova, E., Cheel, J., Pavek, S., Moravcova, M., Hermannova, M. et al. (2013) Epilobium angustifolium extract demonstrates multiple effects on dermal fibroblasts in vitro and skin photo-protection in vivo. *General Physiology and Biophysics* 32, 347–359.
- Salucci, S., Burattini, S., Buontempo, F., Martelli, A.M., Falcieri, E. and Battistelli, M. (2017) Protective effect of different antioxidant agents in UVB-irradiated keratinocytes. *European Journal of Histochemistry* 61, 2784.
- Sample, A. and He, Y.Y. (2018) Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 34, 13–24.
- Shimogaki, H., Tanaka, Y., Tamai, H. and Masuda, M. (2000) In vitro and in vivo evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition. *International Journal of Cosmetic Science* 22, 291–303.
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W. and Packer, L. (1994a) Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 102, 122–124.
- Shindo, Y., Witt, E., Han, D. and Packer, L. (1994b) Dose–response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *Journal of Investigative Dermatology* 102, 470–475.
- Silva, S., Michniak-Kohn, B. and Leonardi, G.R. (2017) An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 92, 367–374.
- Slominski, A., Paus, R. and Schadendorf, D. (1993) Melanocytes as 'sensory' and regulatory cells in the epidermis. *Journal of Theoretical Biology* 164, 103–120.
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. and Wortsman, J. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews* 84, 1155–1228. *Smart Servier Medical Art* [Online]. Available: <https://smart.servier.com/> (accessed 29 September 2017).
- Streilein, J.W., Taylor, J.R., Vincek, V., Kurimoto, I., Richardson, J. et al. (1994) Relationship between ultraviolet radiation-induced immunosuppression and carcinogenesis. *Journal of Investigative Dermatology* 103, 107s–111s.
- Svobodova, A., Rambouskova, J., Walterova, D. and Vostalova, J. (2008) Bilberry extract reduces UVA-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes: a pilot study. *Biofactors* 33, 249–266.
- Umezawa, T. (2003) Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2, 371–390.
- van den Bossche, K., Naeyaert, J.M. and Lambert, J. (2006) The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7, 769–778.
- Vayalil, P. K., Mittal, A., Hara, Y., Elmets, C. A. and Katiyar, S. K. (2004) Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology* 122, 1480–1487.
- Vincensi, M.R., D'Ischia, M., Napolitano, A., Procaccini, E.M., Riccio, G. et al. (1998) Phaeomelanin versus eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects at high risk for melanoma: a pilot study. *Melanoma Research* 8, 53–58.
- Wang, Z.Y., Agarwal, R., Bickers, D.R. and Mukhtar, H. (1991) Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis* 12, 1527–1530.
- Wang, A., Marino, A.R., Gasyna, Z., Gasyna, E. and Norris, J. Jr (2008) Photoprotection by porcine eumelanin against singlet oxygen production. *Photochemistry and Photobiology* 84, 679–682.

- Wei, X., Liu, Y., Xiao, J. and Wang, Y. (2009) Protective effects of tea polysaccharides and polyphenols on skin. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 57, 7757–7762.
- Wölfle, U., Esser, P.R., Simon-Haarhaus, B., Martin, S.F., Lademann, J. and Schempp, C.M. (2011) UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 50, 1081–1093.
- Wu, N.L., Fang, J.Y., Chen, M., Wu, C.J., Huang, C.C. and Hung, C.F. (2011) Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA- and UVB-induced damage. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 59, 8391–8400.
- Wu, P.Y., Lu, J.L., Liu, Y.J., Chien, T.Y., Hsu, H.C., Wen, K.C. and Chiang, H.M. (2017a) Fisetin regulates Nrf2 expression and the inflammation-related signaling pathway to prevent UVB-induced skin damage in hairless mice. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 10.
- Wu, Y.H., Zhang, B.Y., Qiu, L.P., Guan, R.F., Ye, Z.H. and Yu, X.P. (2017b) Structure properties and mechanisms of action of naturally originated phenolic acids and their derivatives against human viral infections. *Current Medicinal Chemistry* 24, 4279–4302.
- Zillich, O.V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. and Kerscher, M. (2015) Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science* 37, 455–464.



Article

# Sweet Cherry Byproducts Processed by Green Extraction Techniques as a Source of Bioactive Compounds with Antiaging Properties

Luz Agulló-Chazarra <sup>1</sup>, Isabel Borrás-Linares <sup>2</sup>, Jesús Lozano-Sánchez <sup>2,3</sup> , Antonio Segura-Carretero <sup>2,4</sup>, Vicente Micol <sup>1,5</sup> , María Herranz-López <sup>1,\*</sup> and Enrique Barrajón-Catalán <sup>1,†</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) and Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universitat Miguel Hernández (UMH), 03202 Elche, Spain; lagullo@umh.es (L.A.-C.); vmicol@umh.es (V.M.); e.barrajon@umh.es (E.B.-C.)

<sup>2</sup> Research and Development Functional Food Centre (CIDAF), Health Science Technological Park, Avenida del Conocimiento 37, BioRegión Building, 18016 Granada, Spain; iborras@cidaf.es (I.B.-L.); jesusls@ugr.es (J.L.-S.); ansegura@ugr.es (A.S.-C.)

<sup>3</sup> Department of Food Science and Nutrition, University of Granada, Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain

<sup>4</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>5</sup> CIBER: CB12/03/30038 Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn, Instituto de Salud Carlos III, 07122 Palma de Mallorca, Spain

\* Correspondence: mherranz@umh.es; Tel.: +34-965222586

† These authors shared author co-seniorship.

Received: 19 April 2020; Accepted: 10 May 2020; Published: 13 May 2020



**Abstract:** In the cosmetic industry, there is a continuous demand for new and innovative ingredients for product development. In the context of continual renovation, both cosmetic companies and customers are particularly interested in compounds derived from natural sources due to their multiple benefits. In this study, novel and green-extractive techniques (pressurized solvent, supercritical CO<sub>2</sub>, and subcritical water extractions) were used to obtain three new extracts from sweet cherry stems, a byproduct generated by the food industry. The extracts were characterized by high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS), and 57 compounds, mainly flavonoids but also organic and phenolic acids, fatty acids, and terpenes, were identified. After analytical characterization, a multistep screening approach, including antioxidant, enzymatic, and photoprotective cellular studies, was used to select the best extract according to its benefits of interest to the cosmetics industry. The extract obtained with supercritical CO<sub>2</sub> presented the best characteristics, including a wide antioxidant capacity, especially against lipid peroxy and •OH free radicals, as well as relevant photoprotective action and antiaging properties, making it a potential new ingredient for consideration in the development of new cosmetics.

**Keywords:** sweet cherry; byproduct; natural extract; antioxidant; cosmetic; HPLC-ESI-QTOF-MS

## 1. Introduction

Currently, society has a higher interest in skin care products obtained from natural sources compared to pharmaceutical compounds obtained by chemical synthesis [1]. Natural extracts have several advantages over synthetic compounds that make them desirable to the cosmetics industry, as society assumes that synthetic compounds can have harmful effects [2]. In addition, the food

industry, including the sweet cherry (SC) industry, is characterized by the generation of a large amount of waste and byproducts that deserve better utilization for economic and environmental reasons. On the one hand, fruit wastes represent large economic losses and may present risks, such as greenhouse gas emissions in landfilling [3]; on the other hand, fruit byproducts are a valuable source of new ingredients for the food [4] and cosmetics [2] industries. The reduction of these food industry residues and byproducts and their revalorization as bioactive cosmetic ingredients contribute to reduce the ecological impact of these companies and is related to “UN 2030 Sustainable Development Goals” numbers 9 (industry, innovation, and infrastructures) and 12 (responsible consumption and production).

Natural extracts have been used traditionally in herbal medicines. The nutritional, chemopreventive, and pharmacological properties of natural extracts highlight the beneficial health effects of plant-derived compounds. In fact, extracts of many plant species have demonstrated antioxidant and anti-inflammatory capacities, and they can also present antitumoral, antimicrobial, or antiaging actions [5–8].

The biological activities of plant extracts are due to their high contents of potential bioactive compounds that can interact with different targets involved in molecular mechanisms related to alterations or diseases. These biological activities are mainly due to the secondary metabolites of plants, which can be classified mainly into polyphenols, terpenoids, alkaloids and sulfur-containing phytochemicals [9]. Secondary metabolites confer color, aroma, and texture and can protect plants against different injuries, such as free radicals, aggression by pathogens, or ultraviolet (UV) radiation. These metabolites are responsible for the medicinal benefits of plant extracts, which have attracted increasing interest in recent years [10–14]. Therefore, with the focus on natural products in the skin care sector, compounds derived from materials used in the food industry could potentially be used as antimicrobials and preservatives, as well as active compounds for the cosmetic industry, in turn, alleviating the abovementioned environmental problem.

*Prunus avium* L., a tree commonly known as SC, belongs to the Rosaceae family. SC trees are widely distributed around the world, with a higher prevalence in temperate climates. In Europe, Spain, Italy, Greece, Poland, Hungary, and Germany produce the most SC [15]. SC fruit is appreciated by consumers due to its taste, color, high content of water, and nutritional and bioactive properties as unprocessed fruit or as juice, jams, and alcoholic beverages. The antioxidant activity and phenolic composition of SC are influenced by climatic factors such as temperature, light intensity, light spectrum, and other environmental factors. These factors alter the activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase, which is related to the accumulation of anthocyanins and other phenolic compounds in SC fruit [16].

The most abundant phenolic compounds in SC fruits are anthocyanins, but phenolic acids such as hydroxycinnamic acids and flavonols are also present [17,18]. In addition to fruits, SC stems are also an interesting source of bioactive compounds, and they are relatively under explored [19–21]. The potential of using cherries, including cherry stems, as a source of extractable bioactive compounds is high, and the use of novel and green extraction procedures, such as pressurized liquid extraction (PLE), subcritical water extraction (SWE), and supercritical fluid extraction (SFE), allows the acquisition of different compounds from SC extracts and enriches the molecular diversity in the search for new drugs and/or cosmetic ingredients.

A previous study by our group [19] provided a preliminary analysis of the compositions of SC stem extracts obtained by these techniques and serves as the basis for this study, whose aim was to study SC stems, a byproduct of SC fruit processing, and SC extracts obtained by green extractive techniques as bioactive ingredients for the cosmetic industry. Thus, the objective of this study was not only in obtaining active ingredients but also in the reutilization of a waste product from the food industry, accessing the associated economic advantages.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents

All chemicals and reagents were of analytical reagent grade. The solvent used for extraction (ethanol) was purchased from Fisher Scientific (Madrid, Spain). For the extraction, in order to avoid possible clogage of the system, dispersive material (sea sand) and cellulose filters were acquired from Fisher Scientific (Madrid, Spain). In the analytical separation, formic acid and acetonitrile were used as mobile phase, as well as gallic acid (internal standard) were acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and Fisher Scientific (Madrid, Spain) respectively. Purified water with resistance value of 18.2 M $\Omega$  for extraction and HPLC analysis was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (Life Technologies Co., Madrid, Spain). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) [22,23].

### 2.2. Plant Material

*Prunus avium* stems were kindly provided by an SC producer (La Picota del Jerte, Valdeastillas, Cáceres, Spain). The stems were collected in May 2015 and immediately air dried to a moisture content of 12%. Then, the stems were grounded and sieved (1 mm hole size) with a Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Germany). The pulverized sample was stored avoiding light, humidity, and high temperature.

### 2.3. Green Extraction Techniques

#### 2.3.1. Pressurized Solvent Extraction (PLE)

The extraction was carried out using a Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extractor (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) equipped with solvent reservoirs, a pump, an oven, a cell tray, and a collection vessel tray, as described previously [19]. Briefly, 6 g of cherry stem powder was mixed with 12 g of sand and packed into a 34 mL stainless steel extraction cell. Moreover, in order to avoid possible blockage of the system by solid particles, cellulose filters and stainless steel frits were disposed at both sides of the extraction cell. The extraction was carried out with ethanol/water (1:1, *v/v*), at a temperature of 40 °C. The extraction was performed in static mode for 20 min at 1500 psi. The extract was collected in vials, filtered through 0.2  $\mu$ m polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filters, and concentrated under vacuum at room temperature using a Savant SC250EXP SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The extracts were stored at -20 °C and protected from light exposure until use.

#### 2.3.2. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

The SFE-CO<sub>2</sub> experiments were performed as previously described using a Waters Prep Supercritical Fluid Extraction system (SFE-100) [19]. For the extraction, 5 g of SC stem powder was mixed with sea sand at a ratio of 1:2. The SFE step was carried out in dynamic mode at 40 °C using a total flow rate of 22 g/min of CO<sub>2</sub> plus 15% ethanol. The extraction pressure was set at 150 bar during the 1 h process. The collected extract was concentrated in a water bath at 40 °C using a rotary evaporator, and was reconstituted in ethanol (co-solvent extraction) up to a concentration of 1000 mg/L. The extract was filtered through 0.2  $\mu$ m PTFE syringe filters (Millipore, Bedford, MA, USA) and then stored at -20 °C until analysis.

#### 2.3.3. Subcritical Water Extraction (SWE)

The SWE was performed in a home-made subcritical water extractor with a 1.7 L high-pressure stainless steel vessel. The extraction was optimized as described elsewhere [21]. The sample was extracted for 30 min at a pressure of 20 bar and a temperature of 150 °C with an agitation rate of 3 Hz. The sample-to-water ratio was 1:90. A flow-through water bath at 20 °C was used to

immediately cool the vessel after extraction. Then, the system was depressurized and purged with pure nitrogen. The extract was filtered, concentrated under vacuum, and stored refrigerated until analysis, as mentioned previously.

#### 2.4. HPLC-ESI-QTOF-MS Analysis

The compositions of the extracts were characterized in depth using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). The SC stem extracts were analyzed using an Agilent 1260 HPLC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a binary pump, an online degasser, a thermostatically controlled autosampler and column compartments, and a diode array detector. The samples were separated on an Agilent ZorBax Eclipse Plus C18 column (1.8  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm) protected by a guard cartridge packed with the same material. The mobile phases consisted of water with 0.1% formic acid as eluent A and acetonitrile as eluent B with the following elution program: at the beginning, the initial conditions were composed of 95%:5% of mobile phase A-B, at 15 min the percentages were A-B 35%:65% B, after 36 min the composition was 5%:95% of phase A-B, then the initial conditions were restored in 4 min and maintained for 5 min before the next injection. Other chromatographic parameters were 10  $\mu\text{L}$  of sample injection, 0.80 mL/min flow rate, column temperature 25  $^{\circ}\text{C}$ , and sample compartment temperature 4  $^{\circ}\text{C}$ .

The mass analyzer coupled to HPLC was an Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF mass spectrometer. This detector registered the signal in negative ionization mode within a mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) range of 100–1700  $m/z$ . The ionization of analytes were performed with a Jet Stream dual ESI interface and using pure nitrogen as nebulizer at a pressure of 20 psi. The optimized ion transfer parameters could be resumed in the use of pure nitrogen at 10 L/min and 325  $^{\circ}\text{C}$  as drying gas, and voltages of 4000 V and 130 V in the capillary and fragmentor, respectively. For a verified identification, several fragmentation analyses were carried out with different collision energies (10 eV, 20 eV, and 40 eV) in order to achieve an optimum fragmentation pattern.

Continuous infusion of the reference ions ( $m/z$  112.985587 (trifluoroacetate anion) and 1033.988109 (adduct of hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazene)) was used to correct each mass spectrum. Both reference ions provided accurate mass measurements typically better than 2 ppm.

All operations, acquisition and analysis of the data were controlled by Masshunter workstation software version B.06.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

#### 2.5. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity Assays

The three extracts from SC stems obtained by SFE, PLE, and SWE (scSFE, scPLE, and scSWE) were dissolved into ethanol EtOH, EtOH-H<sub>2</sub>O (50:50), and H<sub>2</sub>O, respectively, at the desired concentrations. All assays were evaluated in three independent analyses. The total polyphenolic content was determined by the Folin–Ciocalteu method using gallic acid as the standard (% GAE), as described previously [23]. The Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay was performed through decoloration of the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ABTS radical cation (ABTS $\bullet^+$ ) by reducing agents as described in [22], and the results are expressed in millimole (mmol) of Trolox per 100 g of extract by dry weight. The ferric reduction antioxidant power (FRAP) was determined as described elsewhere [24,25], and the FRAP values were calculated using FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O as the standard. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was carried out on a Fluostar Galaxy spectrofluorometric analyzer (BMG Labtechnologies GmbH; Offenburg, Germany), as previously described [25], using 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) as the radical generator. The ORAC values were calculated using a regression equation relating the Trolox concentration and the area under the fluorescence decay curve [22,25]. The ability of the extracts to inhibit lipid peroxidation was studied by using a thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay using small unilamellar vesicles (SUVs) that were prepared by sonicating multilamellar vesicles of soybean phosphatidylcholine (Lipoid GMBH, Steinhausen, Switzerland), as described in [25].

The hydroxyl radical scavenging capacity of the extracts was determined through a modification of the ORAC method and is abbreviated as ORAC<sub>OH</sub> [26,27]. In this assay, 16.7 nM β-phycoerythrin (β-PE) was used as an indicator protein, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cu<sup>2+</sup> (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.3% and 9 mM CuSO<sub>4</sub>) was used as the hydroxyl radical generator. Quercetin (0–750 nM) was used as the control. The fluorescence of β-PE was determined every 2 min after the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cu<sup>2+</sup>. The areas under the β-PE decay curves were used to calculate the quercetin slope and extract slopes. The final results are expressed as micromole (μmol) of quercetin equivalents per milligram (mg) of extract.

The nitric oxide radical scavenging activity was measured using the Griess nitrite assay [28,29]. The amount of nitric oxide radical inhibition (%) was calculated using the following equation, where Abs<sub>control</sub> is the absorbance of the control reaction and Abs<sub>sample</sub> is the absorbance in the presence of the extract:

$$\text{Inhibition \%} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100$$

## 2.6. In Vitro Determination of Antiaging Properties by Enzymatic Assays

For all the enzymatic assays, scSFE was dissolved into EtOH at a final concentration of 0.02% (*w/v*), except for the hyaluronidase inhibition determination. For this assay, a concentration of 0.001% (*w/v*) scSFE was used. Vehicle was also included in controls to discard any interference. These concentrations were selected after preliminary tests to avoid color interferences from the extracts. Statistical significance was determined by comparison with the negative (untreated) control.

The inhibition of collagenase was studied through the degradation of *N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), as described previously [30], and epigallocatechin gallate was used as the positive control for inhibition activity. The effect on tyrosinase was studied spectrophotometrically through the appearance of the substrate dopachrome, and kojic acid was used as the positive control, as described previously [30]. The effect on elastase was measured using *N*-succ-(Ala) 3-nitroanilide (SANA) as the substrate and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) as the positive control, as described in [30]. The hyaluronidase inhibition was determined by a method previously described [30]; the amount of *N*-acetylglucosamine after sodium hyaluronate incubation was measured, and *p*-dimethylaminobenzaldehyde was used as the positive control for inhibition. The antiglycation assay was performed with bovine serum albumin (BSA) as a substrate. Fluorescence was measured 7 days after BSA incubation with threose and diethylenetriaminepentaacetic acid, as described previously [30], using a Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek, Colmar Cedex, France). Aminoguanide was used as a positive control for the inhibition activity. All the samples were evaluated in each assay using three independent samples.

## 2.7. Cell Culturing

Human immortalized keratinocytes from HaCaT cell line were obtained from CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany). The cells were cultured as previously described [22,23] in DMEM supplemented with 10% (*v/v*) FBS and 1% (*v/v*) of antibiotics (0.1 mg/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin) in a humidified atmosphere with CO<sub>2</sub> (5% *v/v*) at 37 °C. The cells were trypsinized following the manufacturer's instructions every third day and seeded in 96-well plates (14,000 cells per well). Extracts were prepared and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 30 mg/mL for every assay.

## 2.8. ROS Generation and Photoprotection Measurements

The 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) fluorescence probe (Molecular probes, Life Technologies Co., Europe) was used to determine the effect of the extract on intracellular reactive oxygen species (ROS) generation induced by UVA and UVB radiation. For this purpose, cells were cultured in black 96-well plates and maintained in medium for 24 h. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and treated with 50 μL of PBS containing the extract (100 and 200 μg/mL,

or equivalent vehicle concentration for controls) during UVB light treatment (800 or 1200 J/m<sup>2</sup>) or UVA radiation (3 or 6 J/m<sup>2</sup>) emitted from Bio-Link Crosslinker BLX-E312 and BLX-365, respectively (Vilber Lourmat, Collégien, France). After irradiation, the PBS was replaced with fresh medium, and the cells were incubated with H<sub>2</sub>DCF-DA (10 µg/mL) for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for the oxidative stress assay. The fluorescence of H<sub>2</sub>DCF-DA was measured using a Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader microplate reader (BioTek, Colmar Cedex, France) with 495 nm excitation and 520 nm emission filters.

The inhibition of ROS was calculated as follows:

$$\text{Inhibition of ROS (\%)} = 100 \times (C_{UV} - \text{sample}) / (C_{UV} - 100)$$

All parameters represent the ROS values normalized to the appropriate nonirradiated controls. C<sub>UV</sub> is the fluorescence signal of the irradiated control without treatment, and sample is the fluorescence signal for the extract-treated samples at the desired UV dose. The results are reported as the mean ± SD of six determinations.

In addition, after washing with PBS, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay was used to determine cell viability after 24 h of UVB irradiation to determine the photoprotective effect of the extracts [14,22,23]. The photoprotection was calculated as follows:

$$\text{Photoprotection (\%)} = 100 \times (C_{UV} - \text{sample}) / (C_{UV} - 100)$$

where C<sub>UV</sub> is the signal of the irradiated control without treatment and sample is the signal of the extract-treated sample at the corresponding UVB dose. The results are expressed as the mean ± SD of six determinations.

### 2.9. Statistical Analysis

Statistical comparisons were developed using GraphPad Prism software v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). One-way ANOVA and Tukey's post-test were employed for data analysis. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ , detailed in the figures using the following symbols: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$  [22,23].

## 3. Results and Discussion

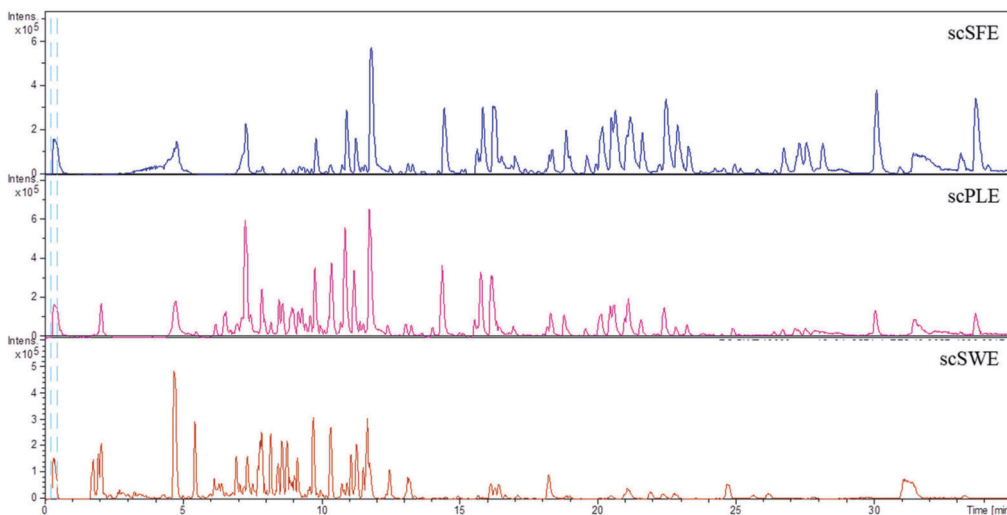
### 3.1. Characterization of Sweet Cherry Stem Extracts by HPLC-ESI-QTOF-MS

The scPLE, scSFE, and scSWE extracts were fully characterized by HPLC-ESI-QTOF-MS. For this analysis, the dried extracts were reconstituted in EtOH, EtOH-H<sub>2</sub>O (50:50), and H<sub>2</sub>O, respectively, up to a concentration of 1000 mg/L. Their chromatographs are shown in Figure 1.

The compounds were tentatively identified using the information provided by the software (accurate masses, isotopic distributions, MS spectra, and molecular formula), together with the fragmentation patterns obtained from tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments in comparison with standards when available or data previously reported in the literature. A total of 57 compounds were identified from 4 different families: (1) organic acids, phenolic acids, and derivatives (8 compounds); (2) flavonoids and derivatives (36 compounds); (3) fatty acid derivatives (9 compounds); and (4) terpenes (4 compounds). Thus, 18 of these compounds are herein identified for the first time in this matrix. The identities of the obtained compounds are summarized in Table 1, and these results significantly advance and complete the previous data available on these extracts obtained using both gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) [21] and HPLC-ESI-QTOF-MS [19].

Semiquantitative comparisons among the different extraction techniques regarding the presence of individual compounds in those extracts can be observed in Table 2. This information is useful for determining which technique is better for extracting particular types of compounds. In general, as depicted in Figure 2, organic and phenolic acids and derivatives are present at higher concentrations

in the extract obtained by SWE (scSWE). In addition, flavonoids were more abundant in the PLE extract (scPLE); as expected, fatty acid derivatives and terpenes, which are nonpolar in nature, were better extracted by SFE (scSFE). Similar results have been reported for other natural compounds, such as marine compounds [31] and polyphenols [32].



**Figure 1.** Base peak chromatograms of the extracts from SC stems obtained by supercritical fluid extraction (SFE; scSFE), pressurized solvent extraction (PLE; scPLE), and subcritical water extraction (SWE; scSWE).

**Table 1.** Analytical data obtained from high-performance liquid chromatography coupled to electrospray quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS) analysis for SC extracts.

Retention Time (min)	$m/z$ Experimental	$m/z$ Calculated	(M – H) <sup>−</sup>	Error (ppm)	Proposed Compound	Extracts
1.91	195.0499	195.0510	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	5.7	D-gluconic acid	scSWE
1.99	191.0552	191.0561	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	5.0	quinic acid	scSWE
5.42	315.0702	315.0722	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub>	6.3	protocatechuic acid hexoside	scSWE
6.52	577.1381	577.1351	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	−5	proanthocyanidin B2 isomer 1	scSFE
6.81	341.0856	341.0878	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	6.6	caffeic acid hexoside	scSFE, scSWE
7.23	289.0732	289.0718	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	−5.1	(epi)catechin isomer 1	scSFE, scPLE, scSWE
7.31	401.1446	401.1453	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>	1.7	benzyl β-primeveroside	scSWE
7.40	137.0243	137.0244	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	0.6	salicylic acid	scSWE
7.43	577.1381	577.1351	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	−5.1	proanthocyanidin B2 isomer 2	scSFE
7.54	771.1977	771.1989	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>21</sub>	1.6	quercetin-rutinoside-glucoside	scSWE
7.60	521.2002	521.2028	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> O <sub>11</sub>	5.1	dihydrodehydrodiconiferyl alcohol glucopyranoside	scSWE
7.64	325.0930	325.0929	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	−0.3	<i>p</i> -coumaric acid <i>O</i> -hexoside	scSFE, scPLE
7.74	449.1094	449.1089	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	−1.1	eriodictyol glucoside isomer 1	scSWE
7.81	165.0557	165.0557	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	0.4	melilotic acid	scSWE
7.83	289.0735	289.0718	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	−5.9	(epi)catechin isomer 2	scSFE, scPLE
7.88	449.1094	449.1089	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	−1.1	eriodictyol glucoside isomer 2	scSWE
8.16	195.0664	195.0663	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	−0.8	dihydroferulic acid	scSWE

Table 1. Cont.

Retention Time (min)	<i>m/z</i> Experimental	<i>m/z</i> Calculated	(M – H) <sup>−</sup>	Error (ppm)	Proposed Compound	Extracts
8.45	609.1482	609.1461	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	−2.1	rutin	scSFE, scSWE
8.58	465.1073	465.1038	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	−3.4	epicatechin- <i>O</i> -glucuronide	scSFE, scPLE, scSWE
8.85	463.0903	463.0882	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	−2.1	quercetin-glucoside	scPLE, scSWE
8.91	431.1011	431.0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	−6.2	genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 1	scSFE, scPLE, scSWE
8.95	593.1534	593.1512	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	−3.7	kaempferol- <i>O</i> -rutinoside	scSFE, scPLE, scSWE
9.13	477.1076	477.1038	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	−7.9	isorhamnetin-glucoside	scSFE, scPLE
9.15	431.1007	431.0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	−5.3	genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 2	scSFE, scPLE
9.28	431.1004	431.0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	−4.6	genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 3	scSFE, scPLE, scSWE
9.42	447.0955	447.0933	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	−4.9	kaempferol- <i>O</i> -glucoside	scSFE, scPLE, scSWE
9.58	431.0995	431.0984	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	−2.7	genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 4	scSFE, scPLE
9.75	433.1158	433.1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	−4.1	naringenin- <i>O</i> -glucoside isomer 1	scSFE, scPLE, scSWE
10.25	433.1123	433.1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	4.0	naringenin- <i>O</i> -glucoside isomer 2	scSFE, scPLE
10.35	417.1182	417.1191	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	2.2	liquiritin	scSWE
10.69	433.1148	433.1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	−1.7	naringenin- <i>O</i> -glucoside isomer 3	scSFE, scPLE
10.74	447.1295	447.1297	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	0.3	sakuranin	scSWE
10.84	415.1064	415.1035	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	−6.2	chrysin- <i>O</i> -glucoside	scSFE, scPLE
10.94	447.129	447.1297	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	1.6	sakuranetin glucopyranoside	scSWE
11.07	417.1204	417.1191	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	−3.1	sakuranetin xylopyranoside	scSWE
11.17	433.1176	433.1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	−8.2	naringenin- <i>O</i> -glucoside isomer 4	scSFE, scPLE
11.27	417.1196	417.1191	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	−1.2	prupersin B	scSWE
11.62	447.1307	447.1297	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	−2.4	dihydrowogonin glucoside	scSWE
12.39	327.2175	327.2177	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub>	0.6	trihydroxy-octadecadienoic acid	scSFE, scPLE, scSWE
12.78	433.1161	433.1140	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	−4.9	naringenin- <i>O</i> -glucoside isomer 5	scSFE, scPLE
13.04	329.2346	329.2333	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	−3.8	trihydroxy-octadecenoic acid	scSFE, scPLE, scSWE
13.23	271.0607	271.0612	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	1.7	naringenin isomer 1	scSFE, scPLE, scSWE
13.53	271.0600	271.0612	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	4.2	naringenin isomer 2	scSFE, scPLE
14.35	517.3187	517.3171	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>7</sub>	−3.2	jaligonic acid	scSFE, scPLE
15.74	501.3250	501.3222	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub>	−5.7	hydroxyceanothoic acid isomer 1	scSFE, scPLE
16.14	253.0503	253.0506	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	1.4	chrysin	scSFE, scPLE, scSWE
16.31	285.0775	285.0768	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	−2.3	methylnaringenin	scSFE, scPLE, scSWE
16.44	255.0644	255.0663	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	7.3	pinocembrin	scSFE, scPLE, scSWE

Table 1. Cont.

Retention Time (min)	<i>m/z</i> Experimental	<i>m/z</i> Calculated	(M – H) <sup>–</sup>	Error (ppm)	Proposed Compound	Extracts
16.77	501.3238	501.3222	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>6</sub>	–3.2	hydroxyceanothoic acid isomer 2	scSFE, scPLE
19.53	293.2122	293.2122	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	0.0	hydroxy-octadecatrienoic acid isomer 1	scSFE, scPLE
19.87	293.2104	293.2122	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	6.1	hydroxy-octadecatrienoic acid isomer 2	scSFE, scPLE
21.52	295.2291	295.2279	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	–4.2	hydroxy-octadecadienoic acid	scSFE, scPLE
23.21	293.2111	293.2122	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	3.7	hydroxy-octadecatrienoic acid isomer 3	scSFE, scPLE
30.02	277.2182	277.2173	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	–3.4	linolenic acid	scSFE, scPLE
31.41	455.3528	455.3531	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	0.7	ursolic acid	scSWE
33.64	279.2327	279.2330	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	1.1	linoleic acid	scSFE, scPLE
34.06	299.2590	299.2592	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>3</sub>	0.4	hydroxy-octadecanoic acid	scSFE, scPLE

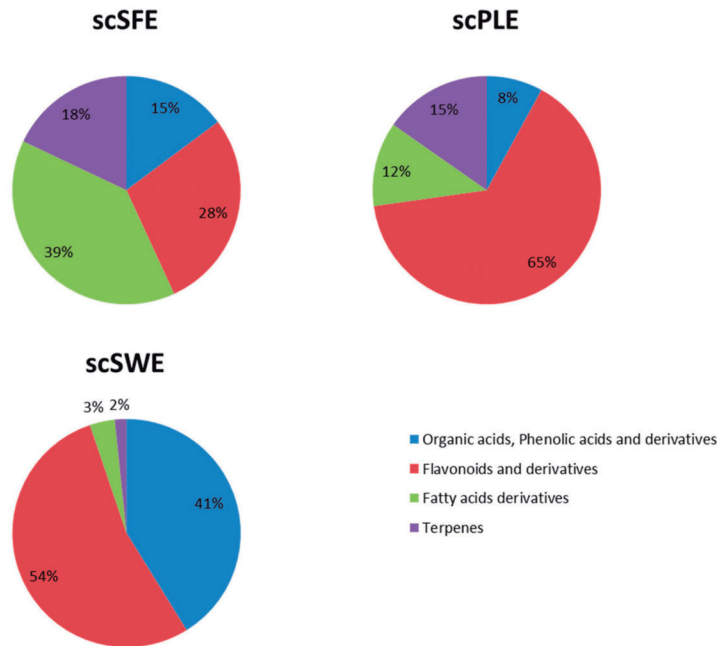
**Table 2.** Relative peak areas of the identified compounds in SC stem extracts expressed as mean ± standard deviation of the three analyses replicates (ND: non-detected compound). For each compound, the best extractive technique is marked in bold format. PLE: pressurized liquid extraction, SWE: subcritical water extraction, SFE: supercritical fluid extraction.

Proposed Compound	Peak Area x E+4		
	PLE	SFE	SWE
<b>Organic acids, phenolic acids, and derivatives</b>			
D-gluconic acid	ND	ND	<b>22.8 ± 0.9</b>
quinic acid	ND	ND	<b>32.0 ± 2.0</b>
caffeic acid hexoside	<b>5.0 ± 0.3</b>	ND	2.2 ± 0.2
<i>p</i> -coumaric acid <i>O</i> -hexoside	<b>12.0 ± 2.0</b>	4.0 ± 0.2	ND
protocatechuic acid hexoside	ND	ND	<b>17.2 ± 0.2</b>
salicylic acid	ND	ND	<b>9.9 ± 0.5</b>
melilotic acid	ND	ND	<b>16.6 ± 0.7</b>
dihydroferulic acid	ND	ND	<b>22 ± 2</b>
<b>Flavonoids and derivatives</b>			
(epi)catechin–(epi)catechin (proanthocyanidin B2) isomer 1	<b>129.0 ± 8.0</b>	ND	ND
(epi)catechin isomer 1	<b>573.0 ± 14.0</b>	282.0 ± 23.0	5.5 ± 0.3
(epi)catechin–(epi)catechin (proanthocyanidin B2) isomer 2	<b>112.0 ± 9.0</b>	ND	ND
(epi)catechin isomer 2	<b>214.0 ± 44.0</b>	44 ± 4	ND
rutin	<b>121.0 ± 3.0</b>	ND	13.4 ± 0.4
epicatechin- <i>O</i> -glucuronide	<b>113.0 ± 1.0</b>	20.0 ± 0.5	25.0 ± 1.0
quercetin-glucoside	<b>67.0 ± 0.6</b>	ND	11.0 ± 1.0
genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 1	<b>89.0 ± 0.1</b>	12.0 ± 0.5	27.8 ± 0.9
kaempferol- <i>O</i> -rutinoside	<b>91.0 ± 4.0</b>	4.0 ± 0.2	6.3 ± 0.5
isorhamnetin-glucoside	<b>15.0 ± 0.2</b>	3.0 ± 0.3	ND
genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 2	<b>65.0 ± 4.0</b>	16.0 ± 1.0	ND
genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 3	<b>102 ± 0.8</b>	24.0 ± 1.0	8.4 ± 0.3
kaempferol- <i>O</i> -glucoside	<b>41.0 ± 2.0</b>	8.0 ± 0.2	4.6 ± 0.6
genistein- <i>O</i> -glucoside isomer 4	<b>82.0 ± 0.0</b>	17.0 ± 1.0	ND

Table 2. Cont.

Proposed Compound	Peak Area x E+4		
	PLE	SFE	SWE
naringenin-O-glucoside isomer 1	94.0 ± 0.2	34.0 ± 1.0	38 ± 1
naringenin-O-glucoside isomer 2	89.0 ± 0.4	40.0 ± 1.0	ND
naringenin-O-glucoside isomer 3	57.0 ± 1.0	34.0 ± 4.0	ND
chrysin-O-glucoside	432.0 ± 14.0	180.0 ± 1.0	ND
naringenin-O-glucoside isomer 4	91.0 ± 0.1	49.0 ± 5.0	ND
naringenin-O-glucoside isomer 5	6.0 ± 0.0	10.0 ± 0.5	ND
naringenin isomer 1	14.0 ± 1.0	13.0 ± 0.8	8.8 ± 0.2
naringenin isomer 2	9 ± 0.2	5 ± 0.4	ND
chrysin	143.0 ± 12.0	143 ± 3	3.8 ± 0.8
methylnaringenin	39.0 ± 2.0	42.0 ± 1.0	3.0 ± 0.3
benzyl β-primeveroside	ND	ND	24.6 ± 0.4
quercetin-rutinoside-glucoside	ND	ND	5.9 ± 0.6
dihydrodehydrodiconiferyl alcohol glucopyranoside	ND	ND	4.6 ± 0.3
eriodictyol-glucoside isomer 1	ND	ND	14.4 ± 0.6
eriodictyol-glucoside isomer 2	ND	ND	36 ± 1
liquiritin	ND	ND	24 ± 1
sakuranin	ND	ND	4.3 ± 0.3
sakuranetin-glucopyranoside	ND	ND	4.9 ± 0.3
sakuranin-xylopyranoside	ND	ND	18.2 ± 0.2
prupersin B	ND	ND	22.3 ± 0.4
dihydrowogonin glucoside	ND	ND	35 ± 2
pinocembrin	ND	ND	5.3 ± 0.1
<b>Fatty acid derivatives</b>			
trihydroxy-octadecadienoic acid	42.0 ± 6.0	29.0 ± 2.0	11.6 ± 0.6
trihydroxy-octadecenoic acid	48.0 ± 2.0	40.0 ± 2.0	7.4 ± 0.2
hydroxy-octadecatrienoic acid isomer 1	19.0 ± 0.3	59.0 ± 0.2	ND
hydroxy-octadecatrienoic acid isomer 2	9.0 ± 0.5	40 ± 0.8	ND
hydroxy-octadecadienoic acid	76.0 ± 2.0	210.0 ± 12.0	ND
hydroxy-octadecatrienoic acid isomer 3	57.0 ± 4.0	121.0 ± 5.0	ND
linolenic acid	129.0 ± 15.0	407.0 ± 39.0	ND
linoleic acid	129.0 ± 2.0	448.0 ± 39.0	ND
hydroxy-octadecanoic acid	13.0 ± 0.3	49.0 ± 3.0	ND
<b>Terpenes</b>			
jalignonic acid	333.0 ± 2.0	297.0 ± 10.0	ND
ursolic acid	ND	ND	58.0 ± 11.0
hydroxyceanothic acid isomer 1	279.0 ± 7.0	273.0 ± 6.0	ND
hydroxyceanothic acid isomer 2	54.0 ± 3.0	78.0 ± 6.0	ND





**Figure 2.** Semiquantitative data regarding the different families of compounds extracted by SFE (scSFE), PLE (scPLE), and SWE (scSWE).

### 3.2. Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of the SC Stem Extracts

After the analytical processing of the extracts, a multistep screening of the three extracts was conducted in three stages to select the best extract with the greatest potential as a novel cosmetic ingredient (see graphical abstract). This screening was designed to evaluate the most relevant biological activities for the cosmetic industry using a collection of *in vitro* and cellular assays, all of which are described in the Materials and Methods section.

The first step evaluated the total phenolic content (TPC). This assay was the first step because polyphenolic compounds are one of the main groups of compounds known to show anti-aging effects and present other biological activities [33,34]. Furthermore, higher polyphenolic contents typically result in more intense biological activities [35,36]. The TPC was evaluated using the Folin-Ciocalteu assay, as described in the Materials and Methods Section. In addition to TPC measurement, this first stage included the TEAC assay, which is accepted as a general method for measuring antioxidant activity. The relationship between the total polyphenolic content and the antioxidant activity has been demonstrated previously by numerous studies published by our group [25,37,38] and others [35,36].

The results for this first stage are presented in Table 3. Among the SC stem extracts, scPLE and scSFE had the highest total polyphenolic contents, and their contents were not significantly different ( $p > 0.05$ ). scSFE showed the highest antioxidant effect in the TEAC assay, followed by scPLE. However, scSWE showed a remarkably lower TPC and antioxidant capacity (at least  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Thus, both assays showed similar trends for the three extracts, with the lowest antioxidant activity for that extract with the lowest polyphenolic content, as expected. On the basis of these results, scSWE was not included in for further screening steps due to its poorer results.

In a second stage, additional antioxidant assays, FRAP and ORAC, were carried out to clarify the antioxidant activities of the selected extracts (scSFE and scPLE). FRAP estimates the Fe(III) reducing activity, whereas the ORAC assay determines the activity related to chain-breaking antioxidants, which is directly related to peroxy radicals. These analyses are more closely related to the biological function of antioxidants [25,39]. The results are shown in Table 4. Both extracts presented significant

antioxidant activities with higher values for scSFE in the ORAC assay and for scPLE in the FRAP assay. These values are higher than those of other extracts from *Cistus* sp. plants obtained by aqueous and hydroalcoholic conventional extraction methods previously characterized by our group [25,38].

**Table 3.** Percentage of gallic acid equivalents (GAE)  $\pm$  standard deviation (SD) determined by the Folin-Ciocalteu assay and antioxidant capacity in millimole (mmol) Trolox eq./100 g extract  $\pm$  SD, determined through Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) for scSFE, scPLE, and scSWE.

Extract	Folin % GAE (w/w)	TEAC mmol Trolox eq./100 g Extract
scSFE	15.26 $\pm$ 2.94	240.61 $\pm$ 11.74
scPLE	18.81 $\pm$ 2.36	220.53 $\pm$ 13.57
scSWE	5.49 $\pm$ 1.16	70.38 $\pm$ 3.89

**Table 4.** Antioxidant capacity of scSFE and scPLE by different methods: ferric reduction antioxidant power (FRAP) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC), giving the antioxidant capacities compared to FeSO<sub>4</sub> and Trolox, respectively. All the results are presented as the mean  $\pm$  SD.

Extract	FRAP mmol FeSO <sub>4</sub> eq./100 g Extract	ORAC mmol Trolox eq./100 g Extract
scSFE	64.83 $\pm$ 6.32	107.77 $\pm$ 5.76
scPLE	203.94 $\pm$ 8.37	64.15 $\pm$ 1.04

Although scSFE and scPLE presented some differences, probably due to differences in their composition, as shown in Section 3.1, both exhibited high antioxidant activities that deserve further investigation. The higher potency of scPLE compared with scSFE in the FRAP assay was probably due to scPLE's higher content of flavonoids bearing a catechol group in their B ring, such as catechins and quercetin derivatives, which can complex metal ions. However, the results for scSFE were more interesting from a cosmetic point of view, as ORAC indicates the capacity to scavenge peroxy free radicals and other radicals derived from lipid peroxidation, and these radicals are frequent in cosmetic products due to the inclusion of oily ingredients in their formulation. Furthermore, the SFE extraction technique is more suitable for scale-up for use at large industrial facilities than is PLE, which is a less developed extraction technique at the industrial level. For these reasons, scSFE was selected for full characterization in the further assays included in the third stage of the screening.

The third stage further elucidated the antioxidant capacity of scSFE through additional antioxidant assays. In this sense, TBARS for the specific study of lipid peroxidation, a modified ORAC method based on OH<sup>•</sup> radicals, and a Griess nitrite-based assay for nitric oxide radicals were performed. The results for all these assays are shown in Table 5.

**Table 5.** Antioxidant capacity of scSFE. The results showed its activity against lipid peroxidation through a thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay (% inhibition of lipid peroxidation of 5 mg/mL of extract), the hydroxyl radical capacity as determined by an ORAC<sub>OH</sub> assay (as  $\mu$ mol quercetin eq./g extract), and the capacity of the extract (200  $\mu$ g/mL) to deplete nitric oxide (% depletion). All the results are presented as the mean  $\pm$  SD.

	TBARS	ORAC <sub>OH</sub>	% NO <sup>•</sup> Depletion
scSFE	45.13 $\pm$ 10.84	189.10 $\pm$ 0.81	29.37 $\pm$ 0.01

scSFE showed a significant antioxidant capacity in all the assays, suggesting that this extract is a good candidate for use as a bioactive ingredient against oxidative stress, as the extract has shown antioxidant capacity through different methods and against different targets, such as lipid peroxidation and different kinds of free radicals.

Antioxidant activities are highly desirable for cosmetic ingredients for several reasons. On the one hand, this activity protects the final formula itself from oxidation, especially from oxidation related

to its oily ingredients. In addition to this advantage, which is mainly related to the final product formulation, the antioxidant activity of the ingredients is probably one of the most commonly used claims in cosmetic products. In this sense, natural extracts have been shown to reduce oxidative stress, mainly due to their polyphenols [40,41]. scSFE contains different families of compounds, as shown in Figure 2, and polyphenols (including flavonoids, organic acids, phenolic acids, and their derivatives) were the most abundant. Thus, the antioxidant effects of scSFE could be mainly due to the polyphenolic compounds present in this extract, but contributions from other compounds, especially terpenes, cannot be discarded. Catechins, naringenin, and chrysin are the main polyphenols in this extract, and thus the reduction in lipid peroxidation and the depletion of hydroxyl radicals and nitric oxide could have been due to these compounds, which have been demonstrated to have antioxidant capacities. Naringenin is a flavanone, catechin is a flavanol, and chrysin is a flavone. Compounds of these types have been shown to have antioxidant activities. Naringenin, which is found in citrus fruits, grapes, and other fruits, has shown antioxidant effects through lipid peroxidation reduction; increases in antioxidant defense; and scavenging free radicals, such as hydroxyl, superoxide, hydrogen peroxide, and nitric oxide radicals [42,43]. Moreover, catechins have been shown to have antioxidant activity through many assays, such as the ABTS and FRAP assays. They protect against AAPH-induced peroxide radicals and lipid peroxidation and can scavenge free radicals [44,45]. In addition to naringenin and catechins, chrysin and its derivatives reduce lipid peroxidation, regulate redox homeostasis, and increase antioxidant enzymes [46,47]. The antioxidant effects of these compounds are related to the carbonyl group at C-4 and the double bond between C2 and C3 [48].

### 3.3. Skin Aging-Related Enzymatic Assays

In this third stage, the putative modulative activities of scSFE on some of the most relevant enzymes related to skin health and appearance were also tested. In this sense, the activities of collagenase, elastase, hyaluronidase, and tyrosinase were challenged with scSFE, as detailed in the Materials and Methods section. These experiments were concluded with a study of the inhibition of advanced glycosylation end product (AGE) formation, conducted as described in the Materials and Methods section. The inhibition of collagenase, tyrosinase, elastase, hyaluronidase, and AGE formation are related to the prevention of the degradation of extracellular matrix (ECM), skin preservation, and antiaging. In fact, plant extracts have been shown to inhibit tyrosinase, collagenase, elastase, and hyaluronidase activity [49–51]. The results, shown in Table 6, are expressed as the percentage of inhibition for each assay.

**Table 6.** Determination of the inhibition (%)  $\pm$  SD of collagenase, tyrosinase, elastase, hyaluronidase, and glycosylation by scSFE. \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) indicate statistically significant differences compared to the corresponding untreated negative control; ns: not statistically significant.

Extract	Percentage of Inhibition				
	Collagenase	Tyrosinase	Elastase	Hyaluronidase	Glycosylation
scSFE	−11.76 $\pm$ 2.71 <sup>ns</sup>	40.47 $\pm$ 19.35 <sup>ns</sup>	164.11 $\pm$ 27.33 <sup>**</sup>	90.80 $\pm$ 5.93 <sup>****</sup>	51.76 $\pm$ 7.06 <sup>****</sup>

Collagen plays a critical role in the appearance and function of the skin; it confers tensile strength and resiliency to the skin and is the main protein in the ECM of the dermis. Its degradation is related to skin wrinkling and aging. Collagenase inhibition is related to the maintenance of skin tensile strength and elasticity, even more so in collagenase induction by ROS or irradiation, which are important factors in aging. In this case, scSFE did not present any collagenase inhibition activity, presenting a negative value, which means that its effect was weaker than that of the negative control but was not statistically significant.

Tyrosinase is an enzyme involved in melanin production, the main defense of organisms against UV irradiation. Melanin absorbs UV radiation and reduces the formation of photoproducts that could be harmful to the skin [52]. Tyrosinase induction is related to skin protection through an increase in

melanin production, and tyrosinase inhibition could be useful in diseases such as vitiligo. As shown in Table 6, scSFE showed a moderate but not statistically significant effect compared with the untreated negative control.

Elastin is an extracellular matrix protein responsible for elasticity in the dermis and other connective tissues by forming elastin fibers. Elastase is an enzyme able to degrade elastin, leading to skin aging and wrinkles. Therefore, the inhibition of elastase is related to skin aging and wrinkle protection. The results in Table 6 indicate that scSFE showed potent elastase inhibition activity, even above the PMSF positive control, and that the effect was significant (\*\*  $p < 0.01$ ).

Hyaluronic acid is found in connective tissue and is part of the ECM. Hyaluronic acid presents water holding properties and maintains the viscosity and the correct permeability of connective tissues and maintains skin hydration. Hyaluronidase degrades hyaluronic acid, and its inhibition is related to the maintenance of high levels of hyaluronic acid, improving the general aspect of skin and specifically skin hydration. scSFE presented potent hyaluronidase inhibition activity, reaching almost 100% of the level obtained for *p*-dimethylaminobenzaldehyde (positive control), and the effect was highly significant (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

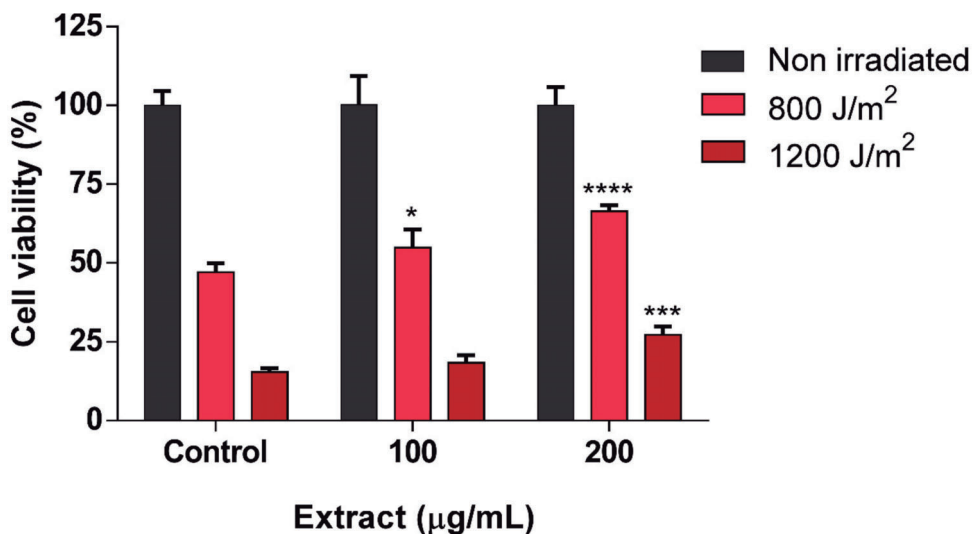
Finally, oxidative stress increases protein glycation, which is responsible for advanced glycosylation end products (AGEs) in skin. AGEs are one of the causes of collagen degradation, leading to skin aging. The inhibition of protein glycation is related to the prevention of aging and wrinkling. As expected by its antioxidant capacity shown in the previous section, scSFE was able to reduce AGE formation by 50% with high statistical significance (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

A wide variety of phytochemicals belonging to different classes of polyphenols, terpenoids, or steroids (e.g., catechins, carnosic acid, ellagic acid, curcumin, and hydroxycinnamic acids) are inhibitors of collagenase, elastase, and hyaluronidase [53–56]. Some plant extracts containing these compounds scavenge free radicals, mainly due to polyphenols, protecting the skin matrix through the inhibition of enzymatic degradation and/or promoting the synthesis of its components, improving skin elasticity and tightness [57,58]. The polyphenols present in scSFE could be responsible for its ability to inhibit cosmetic enzymes. As shown in [59], catechin and epigallocatechin gallate inhibit collagenase and elastase, and naringenin inhibits hyaluronidase. This activity is related to the number of hydroxyl groups, as more available hydroxyl groups result in higher activity, and the inhibition of these enzymes decreases with substitution of hydroxyl groups or glycosylation [60]. Furthermore, an extract of *Libidibia ferrea*, whose main constituents are ellagic acid, catechin, and epicatechin, inhibited elastase, hyaluronidase, and tyrosinase, but presented a weak inhibition of collagenase, similar to what is seen with scSFE [61]. These results may suggest that catechins, which are the main components of scSFE, could be responsible for the activity observed in these cosmetic assays. Further studies must be conducted to identify the molecules related to each inhibition activity, as well as their inhibition mechanisms, as it is documented that natural compounds can interact with these enzymes through different methods, such as competitive and/or noncompetitive inhibition [59,62].

The overproduction or accumulation of melanin could lead to pigmentary disorders such as vitiligo, and it is related to skin aging and photoprotection. Tyrosinase is the enzyme that regulates the hydroxylation of L-tyrosine to form 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), a precursor of melanin. Inhibiting tyrosinase is a method for avoiding disorders related to skin hyperpigmentation, and *in vitro* enzymatic assays, as employed in the present study, are significantly related to melanin synthesis in melanocytes [63]. Some polyphenols obtained from plants can inhibit tyrosinase and melanogenesis. In fact, catechin and its derivatives, such as those present in scSFE, potentially inhibit tyrosinase, and thus these flavanols could be the main flavanols responsible for the tyrosinase inhibition shown by scSFE. In addition, some polyphenol mixtures, such as mixtures of glabridin and resveratrol, show a synergistic tyrosinase inhibition [64]. A synergistic effect could increase the value of plant extracts such as scSFE, which are characterized by the presence of many different compounds. However, a synergistic approach similar to that described in [65] must be developed after the identification of the products responsible for the tyrosinase inhibition and other biological activities.

### 3.4. scSFE Showed Photoprotection Activity against UVB Irradiation

As the last set in the third stage of the screening, the photoprotective effect of scSFE was evaluated in HaCaT cells. Viability after UVB irradiation (800 or 1200 J/m<sup>2</sup>) was first determined through MTT assay in the presence of different concentrations of scSFE (Figure 3).



**Figure 3.** Effect of scSFE extract (100 or 200 µg/mL) on viability after UVB (800 and 1200 J/m<sup>2</sup>) irradiation. Data are expressed as the mean of six replicates ± SD. \* ( $p < 0.05$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ), and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) indicate statistically significant differences compared to an irradiated sample in the absence of the extract. Each condition is normalized with respect to its non-irradiated control.

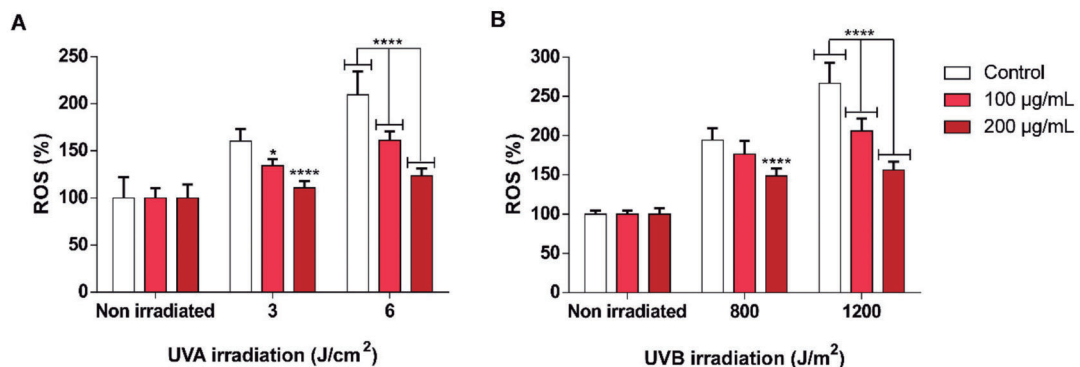
scSFE extract increased the viability of cells 24 h after UVB irradiation compared to the irradiated control. At 800 J/m<sup>2</sup>, 100 µg/mL scSFE extract (0.01% *w/v*) increased cell viability compared to untreated irradiated cells, whereas 100 µg/mL extract did not protect against the 1200 J/m<sup>2</sup> dose. This protective effect was greater in the highest treatment concentration (200 µg/mL, 0.02% *w/v*) after 800 and 1200 J/m<sup>2</sup> irradiation, with a statistically significant protective effect compared to the untreated control. The highest photoprotection activities were observed for 800 J/m<sup>2</sup>, 14.61% with 100 µg/mL extract, and 36.53% photoprotection with 200 µg/mL extract. However, weaker effects were obtained after 1200 J/m<sup>2</sup> of UVB irradiation, with 3.51% and 13.99% photoprotection, respectively, compared to control as shown in Table S1. Similar results with other natural extracts, such as citrus, rosemary, and lemon balm extracts, have been obtained using the same technique, with protection levels ranging from 10% to 80% [22,23,66].

This photoprotective activity of scSFE could be due to various factors. On the one hand, scSFE showed a significant absorption in the UV range in a dose-dependent manner, and thus a substantial portion of the observed keratinocyte photoprotection could be due to the ability of the compounds present in this extract to absorb and scavenge UVB radiation, as many plant extracts have been shown to do [23,67–69]. On the other hand, intracellular mechanisms may be involved in scavenging UVB-induced free radicals, attenuating death mechanisms and/or DNA damage, as other plant extracts have been shown to do [23,70–72]. In fact, some of the main compounds present in scSFE have photoprotective activities through different mechanisms. Naringenin has been shown to increase keratinocyte survival and inhibit apoptosis and pyrimidine dimers after UVB radiation [73]. Epigallocatechin gallate reduces UVB-induced damage in keratinocytes [74,75], and catechin may protect skin cells against UVB-induced damage through its antioxidant activity [76]. In addition, chrysin has shown UVB protection activity by attenuating UVB-induced apoptosis, ROS generation, and cyclooxygenase 2 expression [77,78]. All these data suggest that the photoprotective effects

of scSFE could be due to the different activities of the polyphenols naringenin, catechin, chrysin, and their derivatives, which are the main polyphenolic compounds present in scSFE.

### 3.5. scSFE Inhibited Intracellular ROS Generation Induced by UVA and UVB Light in HaCaT Cells

As mentioned in the previous section, one of the putative mechanisms involved in scSFE photoprotection may be its antioxidant properties. To check if the antioxidant properties shown by scSFE in the previous sections were also present at the cellular level, the antioxidant capacity of the extract was evaluated *in vitro* through the determination of intracellular ROS in the HaCaT cell line. Ultraviolet (UV) A and B were used to induce oxidative stress, as determined by measuring dichlorofluorescein-diacetate H<sub>2</sub>DCF-DA fluorescence, as described in the methods section. Figure 4 shows ROS generation after UVA (3 or 6 J/cm<sup>2</sup>) or UVB (800 or 1200 J/m<sup>2</sup>) irradiation in the absence or presence of the extract compared to the control (without irradiation).



**Figure 4.** Determination of the antioxidant effects of scSFE related to UVA- (A) and UVB- (B) induced reactive oxygen species (ROS) generation in HaCaT cells. Fluorescence was normalized to non-irradiated controls. The white bars indicate the fluorescence signal in the absence of treatment for each condition. The data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). \* ( $p < 0.05$ ) and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) indicate significant differences compared with irradiated cells at the same UVA dose (3 or 6 J/cm<sup>2</sup>) or UVB dose (800 or 1200 J/m<sup>2</sup>) in the absence of scSFE.

Oxidative stress was inhibited by all the concentrations at all the UV doses (both UVA and UVB) tested in this assay. The reduction of fluorescence observed in all conditions is displayed in Table S2.

H<sub>2</sub>DCF-DA is a fluorescent probe that is particularly sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\bullet$ OH, and peroxynitrite radicals at the intracellular level [79]. The ORAC<sub>OH</sub> assay showed that scSFE has a significant capacity to scavenge  $\bullet$ OH, a harmful radical that can be derived from the Fenton reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or from lipid peroxides, and a significant capacity to eliminate NO $\bullet$  radicals, which may form peroxynitrite upon reaction with O<sub>2</sub> $\bullet^-$ . Therefore, the photoprotective properties of scSFE shown in this study may be related to its capacity to decrease the generation of intracellular radical species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\bullet$ OH, or peroxynitrite, which can damage a wide range of molecules in cells, including proteins and DNA [23,80]. The major polyphenolic compounds in scSFE, catechin, chrysin, and naringenin have previously shown antioxidant activity against these free radicals [42–47], with concomitant antioxidant activity against UV-induced oxidative stress [44,73,78], confirming these statements. Similar antioxidant and photoprotective effects from UVA and UVB radiations have been also documented for a well-known cosmetic ingredient, ascorbic acid [81–83], reinforcing the putative potential of scSFE extract as a new cosmetic ingredient.

#### 4. Conclusions

New cosmetic ingredient development is a long and costly process, but there is continuous demand for new products in the cosmetic market. This manuscript tries to address this need through the revalorization of agricultural byproducts such as SC stems.

According to the obtained results, scSFE is a strong candidate for use as a new cosmetic ingredient, especially due to its antioxidant properties, especially against lipid peroxidation, its activity against skin aging-related enzymes, and its photoprotective capability. As indicated in previous studies, these actions are related to its main polyphenolic compounds—catechin, chrysin, and naringenin. However, further studies must be performed on three main topics: the molecular mechanisms involved in these biological activities, the putative pharmacological interactions between the scSFE main compounds, and the compatibility and stability of these compounds or the whole extract when incorporated in a final cosmetic formula.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3921/9/5/418/s1>, Table S1. Percentage of photoprotection for 100 and 200 µg/mL of scSFE extract and 800–1200 J/m<sup>2</sup> of UVB, normalized to its respective irradiated condition. These values were calculated as indicated previously. Table S2. Percentage of oxidative stress inhibition of 100 and 200 µg/mL scSFE extract against oxidative stress induced by UVA and UVB. Doses of 3 and 6 J/cm<sup>2</sup> UVA and 800 and 1200 J/m<sup>2</sup> UVB were used. These values were calculated as indicated previously.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.S.-C., M.H.-L., and E.B.-C.; data curation, L.A.-C. and I.B.-L.; formal analysis, L.A.-C., I.B.-L., J.L.-S., and E.B.-C.; funding acquisition, A.S.-C., V.M., and E.B.-C.; investigation, L.A.-C. and I.B.-L.; methodology, L.A.-C.; project administration, M.H.-L. and E.B.-C.; supervision, J.L.-S., A.S.-C., V.M., M.H.-L., and E.B.-C.; writing—original draft, L.A.-C. and I.B.-L.; writing—review and editing, A.S.-C., V.M., M.H.-L., and E.B.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by projects RTI2018-096724-B-C21 and 2018-096724-B-C22 from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities; APOSTD/2018/097 fellowship from Generalitat Valenciana to M.H.-L. and CIBER (CB12/03/30038, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERObn).

**Acknowledgments:** Authors thank GRAFOR BIOTECH S.L. by its support to the project.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Kerscher, M.; Buntrock, H. Update on cosmeceuticals. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2011**, *9*, 314–326; quiz 327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Peschel, W.; Sánchez, F.; Diekmann, W.; Plescher, A.; Gartzia, I.; Jiménez, D.; Lamuela-Raventós, R.M.; Buxaderas, S.; Codina, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chem.* **2006**, *97*, 137–150. [[CrossRef](#)]
3. Banerjee, J.; Singh, R.; Vijayaraghavan, R.; MacFarlane, D.; Patti, A.F.; Arora, A. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chem.* **2017**, *225*, 10–22. [[CrossRef](#)]
4. Ayala-Zavala, J.F.; Vega-Vega, V.; Rosas-Domínguez, C.; Palafox-Carlos, H.; Villa-Rodríguez, J.A.; Siddiqui, M.W.; Dávila-Aviña, J.E.; González-Aguilar, G.A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1866–1874. [[CrossRef](#)]
5. Sinmisola, A.; Oluwasesan, B.M.; Chukwuemeka, A.P. Blighia sapida k.D. Koenig: A review on its phytochemistry, pharmacological and nutritional properties. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *235*, 446–459. [[CrossRef](#)]
6. Aizat, W.M.; Jamil, I.N.; Ahmad-Hashim, F.H.; Noor, N.M. Recent updates on metabolite composition and medicinal benefits of mangosteen plant. *PeerJ* **2019**, *7*, e6324. [[CrossRef](#)]
7. Losada-Echeberria, M.; Herranz-Lopez, M.; Micol, V.; Barrajon-Catalan, E. Polyphenols as promising drugs against main breast cancer signatures. *Antioxidants* **2017**, *6*, 88. [[CrossRef](#)]
8. Herranz-Lopez, M.; Olivares-Vicente, M.; Encinar, J.A.; Barrajon-Catalan, E.; Segura-Carretero, A.; Joven, J.; Micol, V. Multi-targeted molecular effects of hibiscus sabdariffa polyphenols: An opportunity for a global approach to obesity. *Nutrients* **2017**, *9*, 907. [[CrossRef](#)]

9. Barbieri, R.; Coppo, E.; Marchese, A.; Daglia, M.; Sobarzo-Sanchez, E.; Nabavi, S.F.; Nabavi, S.M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol. Res.* **2017**, *196*, 44–68. [[CrossRef](#)]
10. Boix-Castejon, M.; Herranz-Lopez, M.; Perez Gago, A.; Olivares-Vicente, M.; Caturla, N.; Roche, E.; Micol, V. Hibiscus and lemon verbena polyphenols modulate appetite-related biomarkers in overweight subjects: A randomized controlled trial. *Food Funct.* **2018**, *9*, 3173–3184. [[CrossRef](#)]
11. Peyrol, J.; Meyer, G.; Obert, P.; Dangles, O.; Pechere, L.; Amiot, M.J.; Riva, C. Involvement of bilitranslocase and beta-glucuronidase in the vascular protection by hydroxytyrosol and its glucuronide metabolites in oxidative stress conditions. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *51*, 8–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Quirantes-Pine, R.; Herranz-Lopez, M.; Funes, L.; Borrás-Linares, I.; Micol, V.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of lippia citriodora in rats. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 1112–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Joven, J.; Espinel, E.; Rull, A.; Aragones, G.; Rodriguez-Gallego, E.; Camps, J.; Micol, V.; Herranz-Lopez, M.; Menendez, J.A.; Borrás, I.; et al. Plant-derived polyphenols regulate expression of mirna paralogs mir-103/107 and mir-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 894–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Herranz-Lopez, M.; Fernandez-Arroyo, S.; Perez-Sanchez, A.; Barrajon-Catalan, E.; Beltran-Debon, R.; Menendez, J.A.; Alonso-Villaverde, C.; Segura-Carretero, A.; Joven, J.; Micol, V. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 253–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Goncalves, A.C.; Rodrigues, M.; Santos, A.O.; Alves, G.; Silva, L.R. Antioxidant status, antidiabetic properties and effects on caco-2 cells of colored and non-colored enriched extracts of sweet cherry fruits. *Nutrients* **2018**, *10*, 1688. [[CrossRef](#)]
16. Overbeck, V.; Schmitz, M.; Blanke, M. Targeted forcing improves quality, nutritional and health value of sweet cherry fruit. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 3649–3655. [[CrossRef](#)]
17. Acero, N.; Gradillas, A.; Beltran, M.; Garcia, A.; Munoz Mingarro, D. Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. *Food Chem.* **2019**, *279*, 260–271. [[CrossRef](#)]
18. Pacifico, S.; Di Maro, A.; Petriccione, M.; Galasso, S.; Piccolella, S.; Di Giuseppe, A.M.A.; Scortichini, M.; Monaco, P. Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of autochthonous *Prunus avium* cultivars from campania region. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 188–199. [[CrossRef](#)]
19. Nastić, N.; Lozano-Sánchez, J.; Borrás-Linares, I.; Švarc-Gajić, J.; Segura-Carretero, A. New technological approaches for recovering bioactive food constituents from sweet cherry (*Prunus avium* L.) stems. *Phytochem. Anal.* **2020**, *31*, 119–130.
20. Varc-Gajic, J.; Clavijo, S.; Suarez, R.; Cvetanovic, A.; Cerda, V. Simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction derivatisation and gas chromatography mass spectrometry analysis of subcritical water extracts of sweet and sour cherry stems. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 1943–1953. [[CrossRef](#)]
21. Švarc-Gajić, J.; Cerdà, V.; Clavijo, S.; Suárez, R.; Mašković, P.; Cvetanović, A.; Delerue-Matos, C.; Carvalho, A.P.; Novakov, V. Bioactive compounds of sweet and sour cherry stems obtained by subcritical water extraction. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, *93*, 1627–1635. [[CrossRef](#)]
22. Perez-Sanchez, A.; Barrajon-Catalan, E.; Herranz-Lopez, M.; Castillo, J.; Micol, V. Lemon balm extract (*Melissa officinalis*, L.) promotes melanogenesis and prevents uvb-induced oxidative stress and DNA damage in a skin cell model. *J. Dermatol. Sci.* **2016**, *84*, 169–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Perez-Sanchez, A.; Barrajon-Catalan, E.; Caturla, N.; Castillo, J.; Benavente-Garcia, O.; Alcaraz, M.; Micol, V. Protective effects of citrus and rosemary extracts on uv-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J. Photochem. Photobiol. B* **2014**, *136*, 12–18. [[CrossRef](#)]
24. Fernandez-Arroyo, S.; Herranz-Lopez, M.; Beltran-Debon, R.; Borrás-Linares, I.; Barrajon-Catalan, E.; Joven, J.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A.; Micol, V. Bioavailability study of a polyphenol-enriched extract from hibiscus sabdariffa in rats and associated antioxidant status. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 1590–1595. [[CrossRef](#)]



25. Barrajon-Catalan, E.; Fernandez-Arroyo, S.; Saura, D.; Guillen, E.; Fernandez-Gutierrez, A.; Segura-Carretero, A.; Micol, V. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2273–2282. [[CrossRef](#)]
26. Cao, G.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 303–311. [[CrossRef](#)]
27. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749–760. [[CrossRef](#)]
28. Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmacogn. J.* **2013**, *21*, 143–152. [[CrossRef](#)]
29. Silva, I.K.; Soysa, P. Evaluation of phytochemical composition and antioxidant capacity of a decoction containing *Adenanthera pavonina* L. and *Thespesia populnea* L. *Pharmacogn. Mag.* **2011**, *7*, 193–199.
30. Roy, A.; Sahu, R.K.; Matlam, M.; Deshmukh, V.K.; Dwivedi, J.; Jha, A.K. In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, *7*, 97–106.
31. Grosso, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Andrade, P.B. Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 3182–3230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Talmaciu, A.I.; Volf, I.; Popa, V.I. A comparative analysis of the ‘green’ techniques applied for polyphenols extraction from bioresources. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12*, 1635–1651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mukherjee, P.K.; Maity, N.; Nema, N.K.; Sarkar, B.K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine* **2011**, *19*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sanchez-Marzo, N.; Perez-Sanchez, A.; Ruiz-Torres, V.; Martinez-Tebar, A.; Castillo, J.; Herranz-Lopez, M.; Barrajon-Catalan, E. Antioxidant and photoprotective activity of apigenin and its potassium salt derivative in human keratinocytes and absorption in caco-2 cell monolayers. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2148. [[CrossRef](#)]
35. Rosero, J.C.; Cruz, S.; Osorio, C.; Hurtado, N. Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (*persea americana* mill.) cultivated in colombia. *Molecules* **2019**, *24*, 3209. [[CrossRef](#)]
36. Zhao, C.N.; Tang, G.Y.; Cao, S.Y.; Xu, X.Y.; Gan, R.Y.; Liu, Q.; Mao, Q.Q.; Shang, A.; Li, H.B. Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants* **2019**, *8*, 215. [[CrossRef](#)]
37. Ahmad-Qasem, M.H.; Barrajon-Catalan, E.; Micol, V.; Cárcel, J.A.; Garcia-Perez, J.V. Influence of air temperature on drying kinetics and antioxidant potential of olive pomace. *J. Food Eng.* **2013**, *119*, 516–524. [[CrossRef](#)]
38. Tomás-Menor, L.; Morales-Soto, A.; Barrajon-Catalan, E.; Roldán-Segura, C.; Segura-Carretero, A.; Micol, V. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various spanish cistus species. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *55*, 313–322. [[CrossRef](#)]
39. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Deemer, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (orac) and ferric reducing antioxidant power (frap) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3122–3128. [[CrossRef](#)]
40. Umeno, A.; Horie, M.; Murotomi, K.; Nakajima, Y.; Yoshida, Y. Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules* **2016**, *21*, 708. [[CrossRef](#)]
41. He, M.T.; Lee, A.Y.; Park, C.H.; Cho, E.J. Protective effect of cordyceps *militaris* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in vitro. *Nutr. Res. Pract.* **2019**, *13*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Salehi, B.; Fokou, P.V.T.; Sharifi-Rad, M.; Zucca, P.; Pezzani, R.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rashmi, R.; Bojan Magesh, S.; Mohanram Ramkumar, K.; Suryanarayanan, S.; Venkata SubbaRao, M. Antioxidant potential of naringenin helps to protect liver tissue from streptozotocin-induced damage. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *7*, 76–84.
44. Grzesik, M.; Naparło, K.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartoszyńska, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem.* **2018**, *241*, 480–492. [[CrossRef](#)]
45. Koch, W.; Kukula-Koch, W.; Glowinski, K. Catechin composition and antioxidant activity of black teas in relation to brewing time. *J. Aoac. Int.* **2017**, *100*, 1694–1699. [[CrossRef](#)]
46. Mani, R.; Natesan, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry* **2018**, *145*, 187–196. [[CrossRef](#)]

47. Niu, Q.; Gao, Y.; Liu, P. Optimization of microwave-assisted extraction, antioxidant capacity, and characterization of total flavonoids from the leaves of *alpinia oxyphylla* miq. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *50*, 82–90. [[CrossRef](#)]
48. Naz, S.; Imran, M.; Rauf, A.; Orhan, I.E.; Shariati, M.A.; Iahtisham Ul, H.; Plygun, S.; Shahbaz, M.; Qaisrani, T.B.; Shah, Z.A.; et al. Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sci.* **2019**, *235*, 116797. [[CrossRef](#)]
49. Thring, T.S.; Hili, P.; Naughton, D.P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **2009**, *9*, 27. [[CrossRef](#)]
50. Burlando, B.; Pastorino, G.; Salis, A.; Damonte, G.; Clericuzio, M.; Cornara, L. The bioactivity of hedysarum coronarium extracts on skin enzymes and cells correlates with phenolic content. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1984–1991. [[CrossRef](#)]
51. Chatatikun, M.; Chiabchalard, A. Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kobayashi, N.; Muramatsu, T.; Yamashina, Y.; Shirai, T.; Ohnishi, T.; Mori, T. Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. *J. Investig. Dermatol.* **1993**, *101*, 685–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hartmann, A.; Gostner, J.; Fuchs, J.E.; Chaita, E.; Aliagiannis, N.; Skaltsounis, L.; Ganzera, M. Inhibition of collagenase by mycosporine-like amino acids from marine sources. *Planta Med.* **2015**, *81*, 813–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Vostalova, J.; Tinkova, E.; Biedermann, D.; Kosina, P.; Ulrichova, J.; Rajnochova Svobodova, A. Skin protective activity of silymarin and its flavonolignans. *Molecules* **2019**, *24*, 1022. [[CrossRef](#)]
55. Tundis, R.; Loizzo, M.R.; Bonesi, M.; Menichini, F. Potential role of natural compounds against skin aging. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1515–1538. [[CrossRef](#)]
56. Baiao, D.D.S.; de Freitas, C.S.; Gomes, L.P.; da Silva, D.; Correa, A.; Pereira, P.R.; Aguila, E.M.D.; Paschoalin, V.M.F. Polyphenols from root, tubercles and grains cropped in brazil: Chemical and nutritional characterization and their effects on human health and diseases. *Nutrients* **2017**, *9*, 1044. [[CrossRef](#)]
57. Binic, I.; Lazarevic, V.; Ljubenovic, M.; Mojsa, J.; Sokolovic, D. Skin ageing: Natural weapons and strategies. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 827248. [[CrossRef](#)]
58. Dzialo, M.; Mierziak, J.; Korzun, U.; Preisner, M.; Szopa, J.; Kulma, A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 160. [[CrossRef](#)]
59. Eun Lee, K.; Bharadwaj, S.; Yadava, U.; Gu Kang, S. Evaluation of caffeine as inhibitor against collagenase, elastase and tyrosinase using in silico and in vitro approach. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 927–936. [[CrossRef](#)]
60. Zaluski, D.; Olech, M.; Kuzniewski, R.; Verpoorte, R.; Nowak, R.; Smolarz, H.D. Lc-esi-ms/ms profiling of phenolics from *eleutherococcus* spp. Inflorescences, structure-activity relationship as antioxidants, inhibitors of hyaluronidase and acetylcholinesterase. *Saudi Pharm. J.* **2017**, *25*, 734–743. [[CrossRef](#)]
61. Pedrosa, T.D.; Barros, A.O.; Nogueira, J.R.; Fruet, A.C.; Rodrigues, I.C.; Calcagno, D.Q.; Smith, M.A.; de Souza, T.P.; Barros, S.B.; de Vasconcellos, M.C.; et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of juca (*Libidibia ferrea* mart.) extracts. *Arch. Dermatol. Res.* **2016**, *308*, 643–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ochocka, R.; Hering, A.; Stefanowicz-Hajduk, J.; Cal, K.; Baranska, H. The effect of mangiferin on skin: Penetration, permeation and inhibition of ecm enzymes. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Promden, W.; Viriyabancha, W.; Monthakantirat, O.; Umehara, K.; Noguchi, H.; De-Eknamkul, W. Correlation between the potency of flavonoids on mushroom tyrosinase inhibitory activity and melanin synthesis in melanocytes. *Molecules* **2018**, *23*, 1403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Zolghadri, S.; Bahrami, A.; Hassan Khan, M.T.; Munoz-Munoz, J.; Garcia-Molina, F.; Garcia-Canovas, F.; Saboury, A.A. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 279–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Herranz-López, M.; Losada-Echeberriá, M.; Barrañón-Catalán, E. The multitarget activity of natural extracts on cancer: Synergy and xenohormesis. *Medicines* **2018**, *6*, 6. [[CrossRef](#)]
66. Sánchez-Marzo, N.; Pérez-Sánchez, A.; Barrañón-Catalán, E.; Castillo, J.; Herranz-López, M.; Micol, V. Rosemary diterpenes and flavanone aglycones provide improved genoprotection against uv-induced DNA damage in a human skin cell model. *Antioxidants* **2020**, *9*, 255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Kostyuk, V.; Potapovich, A.; Albuhaydar, A.R.; Mayer, W.; De Luca, C.; Korkina, L. Natural substances for prevention of skin photoaging: Screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation Res.* **2018**, *21*, 91–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Almeida, I.F.; Pinto, A.S.; Monteiro, C.; Monteiro, H.; Belo, L.; Fernandes, J.; Bento, A.R.; Duarte, T.L.; Garrido, J.; Bahia, M.F.; et al. Protective effect of c. Sativa leaf extract against uv mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *144*, 28–34. [[CrossRef](#)]
69. Moreira, L.C.; de Avila, R.I.; Veloso, D.; Pedrosa, T.N.; Lima, E.S.; do Couto, R.O.; Lima, E.M.; Batista, A.C.; de Paula, J.R.; Valadares, M.C. In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of eugenia dysenterica dc. (myrtaceae): Prospects for developing a new dermocosmetic product. *Toxicol. In Vitro* **2017**, *45*, 397–408. [[CrossRef](#)]
70. Cavinato, M.; Waltenberger, B.; Baraldo, G.; Grade, C.V.C.; Stuppner, H.; Jansen-Durr, P. Plant extracts and natural compounds used against uvb-induced photoaging. *Biogerontology* **2017**, *18*, 499–516. [[CrossRef](#)]
71. Magcwebeba, T.; Swart, P.; Swanevelder, S.; Joubert, E.; Gelderblom, W. Anti-inflammatory effects of aspalathus linearis and cyclopia spp. Extracts in a uvb/keratinocyte (hacat) model utilising interleukin-1alpha accumulation as biomarker. *Molecules* **2016**, *21*, 1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Wu, P.Y.; Huang, C.C.; Chu, Y.; Huang, Y.H.; Lin, P.; Liu, Y.H.; Wen, K.C.; Lin, C.Y.; Hsu, M.C.; Chiang, H.M. Alleviation of ultraviolet b-induced photodamage by coffea arabica extract in human skin fibroblasts and hairless mouse skin. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. El-Mahdy, M.A.; Zhu, Q.; Wang, Q.E.; Wani, G.; Patnaik, S.; Zhao, Q.; Arafa el, S.; Barakat, B.; Mir, S.N.; Wani, A.A. Naringenin protects hacat human keratinocytes against uvb-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 307–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kim, E.; Hwang, K.; Lee, J.; Han, S.Y.; Kim, E.M.; Park, J.; Cho, J.Y. Skin protective effect of epigallocatechin gallate. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Singh, B.N.; Shankar, S.; Srivastava, R.K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (egcg): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1807–1821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Jeon, S.E.; Choi-Kwon, S.; Park, K.A.; Lee, H.J.; Park, M.S.; Lee, J.H.; Kwon, S.B.; Park, K.C. Dietary supplementation of (+)-catechin protects against uvb-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2003**, *19*, 235–241. [[CrossRef](#)]
77. Hu, Y.; Ma, Y.; Wu, S.; Chen, T.; He, Y.; Sun, J.; Jiao, R.; Jiang, X.; Huang, Y.; Deng, L.; et al. Protective effect of cyanidin-3-o-glucoside against ultraviolet b radiation-induced cell damage in human hacat keratinocytes. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 301. [[CrossRef](#)]
78. Wu, N.L.; Fang, J.Y.; Chen, M.; Wu, C.J.; Huang, C.C.; Hung, C.F. Chrysin protects epidermal keratinocytes from uva- and uvb-induced damage. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8391–8400. [[CrossRef](#)]
79. Myhre, O.; Andersen, J.M.; Aarnes, H.; Fonnum, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1575–1582. [[CrossRef](#)]
80. Ichihashi, M.; Ueda, M.; Budiayanto, A.; Bito, T.; Oka, M.; Fukunaga, M.; Tsuru, K.; Horikawa, T. Uv-induced skin damage. *Toxicology* **2003**, *189*, 21–39. [[CrossRef](#)]
81. Kawashima, S.; Funakoshi, T.; Sato, Y.; Saito, N.; Ohsawa, H.; Kurita, K.; Nagata, K.; Yoshida, M.; Ishigami, A. Protective effect of pre- and post-vitamin c treatments on uvb-irradiation-induced skin damage. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Gęgotek, A.; Ambrożewicz, E.; Jastrzab, A.; Jarocka-Karpowicz, I.; Skrzydlewska, E. Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to uva and uvb radiation. *Arch. Dermatol. Res.* **2019**, *311*, 203–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Yasuda, S.; Tada, M.; Yamada, K.; Takahata, K. Suppressive effects of ascorbate derivatives on ultraviolet-b-induced injury in hacat human keratinocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2004**, *40*, 71–73. [[CrossRef](#)]

