



FACULTAD DE FARMACIA

ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

LABORATORIO DE QUÍMICA DE METABOLITOS BIOACTIVOS

LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEL EXTRACTO EN POLIETILENGLICOL DE
Lampayo medicinalis F. PHIL (VERBENACEAE) PARA SU USO COMO AGENTE
COSMETICO ANTIACNÉ Y FOTOPROTECTOR

Unidad de Investigación II para optar al Título de Químico Farmacéutico

FLORENCIA CONSTANZA ALVARADO ACEVEDO

Directores: DRA. WALESKA ESTHER VERA QUEZADA

DR. DANIEL FRANCISCO MORAGA ESPINOZA

Co-directora: DRA. JESSICA ANDREA BRAVO GARRIDO

JULIO DE 2025

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a todas las mujeres que me han acompañado y apoyado en este proceso universitario, sin ustedes no hubiese podido hacerlo. Son lo mejor.

Agradecimientos

Primero que nada, agradecer a los laboratorios que me acogieron para poder llevar a cabo este proyecto, por confiar en mí y verle futuro a esta idea. Al LAQUIMEB, al LATEFAR y al Laboratorio de Productos Naturales Bioactivos de la UDP por prestarme los espacios y los materiales necesarios para trabajar.

Del LAQUIMEB, agradecer profundamente la dirección de la profesora Waleska Vera, por tenerme paciencia con mis tiempos y mi neurodivergencia, y siempre estar disponible para resolver mis dudas. También a Valeska Guevara, por su disposición incondicional a ayudarme cuando lo necesité, y a todas las conversaciones, chistes, chismes y almuerzos que compartimos que hicieron de este proceso de tesis mil veces más agradable.

Del LATEFAR, al profesor Daniel Moraga, por darme la oportunidad de trabajar en nombre de su laboratorio y desarrollar métodos experimentales novedosos, agradezco mucho la guía y la comprensión, sobre todo el ayudarme a resolver cuando me encontraba con obstáculos en el camino.

Del Laboratorio de Productos Naturales Bioactivos, a la profesora Jessica Bravo y a todo el equipo con el que compartí, estoy infinitamente agradecida por acogerme en su laboratorio y disponer recursos para sacar adelante este proyecto, no me conocían de nada, pero igual me ayudaron en todo lo que podían. Aprendí muchísimo en su laboratorio, inolvidable la experiencia y la *Cutibacterium acnes* porfiada.

A mis amigas de la universidad, mi cariño por ustedes es infinito, nunca olvidaré nuestro tiempo en la facultad, las risas, el apañe, el cariño, la empatía, realmente ustedes fueron clave para hacer de la experiencia universitaria más disfrutable, soy muy afortunada de haberme cruzado con ustedes en esta etapa de la vida.

A todas mis amigas, por estar ahí para mí, por apoyarme siempre, por quererme de manera incondicional, y por regalarme muchas experiencias maravillosas a lo largo de la carrera a pesar de la distancia o la poca disponibilidad de tiempo por estar todas ocupadas.

A mi mamá, a mis hermanas, a mis tíos y mis sobrinos, por quererme tanto y siempre tirarme para arriba, por nunca dudar de mí y confiar en mi potencial. Por motivarme a no rendirme y siempre apoyarme, fueron una parte fundamental para poder completar la carrera.

Y a mi amiga Catalina Caballero, que sin ella este trabajo nunca hubiese visto la luz porque fue la mente maestra de pensar en el lampayo como un protector solar. Eres maravillosa, muy agradecida de poder haber compartido contigo en el laboratorio, fuiste una persona clave en mi paso por la UV.

Muchas gracias por creer en mí y en este proyecto, sin duda nada de esto hubiera sido posible sin ustedes, gracias por existir en mi vida y acompañarme en el proceso.

Resumen

Este proyecto investigó el potencial del extracto de *Lampayo medicinalis* F. Phil disuelto en polietilenglicol (PEG), con el objetivo de validar sus propiedades antibacterianas y fotoprotectoras para su posible uso cosmético. Se obtuvieron extractos mediante maceración en PEG durante tres días (L3D) y tres meses (L3M), a partir de material vegetal identificado botánicamente. A continuación, se realizó un tamizaje fitoquímico preliminar para orientar la caracterización química de los extractos, complementado con la cuantificación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y de flavonoides totales a través de la formación de complejos con AlCl_3 .

La actividad antimicrobiana se evaluó frente a *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, utilizando el método de difusión en agar y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en placas de 96 pocillos. La capacidad antioxidante se determinó mediante los ensayos cualitativo y cuantitativo con el radical DPPH. Asimismo, se formularon geles cosméticos a base de los extractos y se evaluó su actividad fotoprotectora, tanto de forma cuantitativa a través del cálculo del factor de protección solar (FPS), como cualitativa mediante exposición a luz UV de amplio espectro. Además, se desarrolló un modelo de piel artificial utilizando gelatina, glicerina y formaldehído, con el objetivo de simular *in vitro* las propiedades de elasticidad y retención de humedad de la piel humana, y evaluar sobre este soporte las formulaciones cosméticas.

Los extractos mostraron rendimientos de 62,48% y 65,47% p/p para el macerado de tres días y tres meses respectivamente. El tamizaje fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, saponinas, triterpenos, terpenoides, taninos, flavonoides, glucósidos, cumarinas y quinonas. El contenido de polifenoles fue de $96,1 \pm 4,5$ mg y $91,0 \pm 4,5$ mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/mL, mientras que el contenido de flavonoides alcanzó $24,1 \pm 3,6$ mg y $21,2 \pm 2,4$ mg equivalentes de quercetina (EQ)/mL, para los extractos de tres días y tres meses respectivamente. La MIC frente a *C. acnes* fue de 25 mg/mL, mientras que para *S. aureus* y *S. epidermidis* fue superior a 50 mg/mL. La actividad antioxidante, medida por inhibición del radical DPPH, fue de $30,13 \pm 4,97\%$ y $30,06 \pm 1,55\%$. En cuanto a la formulación cosmética, se logró desarrollar un gel compatible a base de carbopol, y se estableció un factor de protección solar de 12,12 y 11,94 en los geles respectivos (inferior al mínimo de 15 FPS en productos de mercado), además de comprobar cualitativamente su capacidad para bloquear la radiación UV. Los resultados respaldan el potencial de *Lampayo medicinalis* como ingrediente activo en productos cosméticos con efecto antiacné y fotoprotector, con la posibilidad de mejorar su FPS con mayor concentración del extracto en la formulación, abriendo así nuevas perspectivas para su aprovechamiento terapéutico.

Palabras clave: *Lampayo medicinalis*, acné, *Cutibacterium acnes*, actividad antibacteriana, actividad antioxidante, fotoprotección.

Evaluation of the Potential of the Polyethylene Glycol Extract of *Lampayo medicinalis* F. Phil (Verbenaceae) for Its Use as an Anti-Acne and Photoprotective Cosmetic Agent

Abstract

This project investigated the potential of *Lampayo medicinalis* F. Phil in polyethylene glycol (PEG) as solvent, with the aim of validating its antibacterial and photoprotective properties for potential cosmetic use. Extracts were obtained by maceration in PEG for three days and three months, using botanically identified plant material. A preliminary phytochemical screening was performed to guide the chemical characterization of the extracts, complemented by the quantification of total polyphenols using the Folin-Ciocalteu method and total flavonoids through aluminum chloride (AlCl_3) complex formation.

Antimicrobial activity was assessed against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* using the agar diffusion method and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) in 96-well microplates. Antioxidant capacity was evaluated using both qualitative and quantitative DPPH radical scavenging assays. In addition, cosmetic gels were formulated based on the extracts, and their photoprotective activity was analyzed both quantitatively, by calculating the sun protection factor (SPF), and qualitatively, through exposure to broad-spectrum UV light. An artificial skin model was also developed using gelatin, glycerin, and formaldehyde to simulate the in vitro elasticity and moisture-retention properties of human skin, enabling testing of cosmetic formulations.

The extraction yields were 62.48% and 65.47% p/p for the three-day and three-month extracts, respectively. Phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, saponins, triterpenes, terpenoids, tannins, flavonoids, glycosides, coumarins, and quinones. Total polyphenol content was 96.1 ± 4.5 mg and 91.0 ± 4.5 mg gallic acid equivalents (GAE)/mL, while total flavonoid content was 24.1 ± 3.6 mg and 21.2 ± 2.4 mg quercetin equivalents (QE)/mL for the three-day and three-month extracts, respectively. The MIC against *C. acnes* was 25 mg/mL, while MICs for *S. aureus* and *S. epidermidis* exceeded 50 mg/mL. Antioxidant activity, measured by DPPH inhibition, was $30.13 \pm 4.97\%$ and $30.06 \pm 1.55\%$. A compatible cosmetic gel was successfully formulated using Carbopol, with SPF values of 12.12 and 11.94 (lower than the minimum of 15 FPS in market products), (lower than the minimum of 15 FPS in market products), and UV-blocking capacity confirmed through qualitative assays. These findings support the potential of *Lampayo medicinalis* as an active cosmetic ingredient with anti-acne and photoprotective properties, with the possibility of improving its SPF with a higher concentration of the extract in the formulation, thus opening new opportunities for therapeutic applications.

Keywords: *Lampayo medicinalis*, acne, *Cutibacterium acnes*, antibacterial activity, antioxidant activity, photoprotection.

Glosario de términos

Polietilenglicol (PEG): Polímero hidrosoluble utilizado como vehículo para la extracción de compuestos activos en formulaciones farmacéuticas y cosméticas.

Extracto vegetal: Solución concentrada que contiene compuestos bioactivos obtenidos a partir de material vegetal mediante técnicas de extracción, como la maceración.

Maceración: Método extractivo que consiste en mantener el material vegetal en contacto con un solvente durante un tiempo determinado para disolver sus componentes activos.

Tamizaje fitoquímico: Conjunto de pruebas cualitativas utilizadas para identificar grupos funcionales o clases de metabolitos secundarios presentes en un extracto vegetal, como alcaloides, flavonoides, taninos, entre otros.

Polifenoles: Compuestos vegetales con múltiples grupos fenólicos, conocidos por su capacidad antioxidante y sus efectos beneficiosos en la piel.

Flavonoides: Subgrupo de polifenoles con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y fotoprotectoras.

Actividad antimicrobiana: Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento de microorganismos.

Difusión en agar: Ensayo microbiológico que permite observar la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de un disco impregnado con antibiótico o extracto, formando un halo de inhibición.

Concentración mínima inhibitoria (MIC): Mínima concentración del extracto que inhibe visiblemente el crecimiento bacteriano. Se determina generalmente en microplacas de 96 pocillos.

Actividad antioxidante (DPPH): Evaluación de la capacidad de los extractos para neutralizar radicales libres mediante el método del radical DPPH, que cambia de color al ser reducido.

Factor de Protección Solar (FPS): Índice que mide la eficacia de un producto para proteger la piel frente a la radiación UVB.

Luz UV de amplio espectro: Fuente de radiación ultravioleta que emite en los rangos UVA y UVB.

Carbopol: Polímero sintético utilizado como agente espesante y estabilizante en productos cosméticos y farmacéuticos. Permite formular geles transparentes y estables.

Piel artificial: Modelo *in vitro* desarrollado con biopolímeros como gelatina, glicerina y formaldehído, diseñado para simular propiedades biomecánicas y de humedad de la piel humana.

Abreviaciones

C. acnes: *Cutibacterium acnes*.

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

S. epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*.

AMPs: Péptidos antimicrobianos.

TLRs: Receptores tipo Toll.

IL-1, IL-6, IL-8: Interleucinas 1, 6 y 8.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

%: Porcentaje/porciento.

L. medicinalis: *Lampayo medicinalis*.

FPS: Factor de protección solar.

UV, UVA, UVB: Radiación ultravioleta, A y B.

PEG: Polietilenglicol.

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

3R: Principio de las tres erres en bioética.

L3D: Extracto de lampayo macerado por 3 días

L3M: Extracto de lampayo macerado por 3 meses.

HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución-masa/masa.

LB: Libermann-Burchardt

CPT: Contenido de polifenoles totales.

CFT: Contenido de flavonoides totales.

mg EQ/mL: Miligramos equivalentes de quercetina por mililitro de extracto

mg EAG/mL: Miligramos de equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto

OD: Densidad de absorbancia.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro de suspensión bacteriana.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

AOX: Antioxidante.

Indice

1.	Introducción	1
2.	Objetivos	9
1)	Objetivo general	9
2)	Objetivos específicos	9
3.	Metodología	10
1)	Material vegetal	10
2)	Identificación taxonómica	10
3)	Procesamiento del material y análisis de partículas	10
4)	Preparación del extracto en PEG de <i>L. medicinalis</i>	10
5)	Caracterización física del extracto	11
I.	Propiedades organolépticas	11
II.	Densidad	11
III.	Viscosidad relativa	11
IV.	pH	11
6)	Tamizaje fitoquímico	11
7)	Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu	14
8)	Determinación del contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de $AlCl_3$	15
9)	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de <i>L. medicinalis</i>	15
I.	Tinción Gram	16
II.	Ensayo de difusión en agar	16
III.	Ensayo para determinar Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	17
10)	Determinación de la actividad antioxidante	18
I.	Método cualitativo	18
II.	Método cuantitativo DPPH	18
11)	Elaboración de formulación tópica con extracto en PEG de <i>L. medicinalis</i>	19
12)	Actividad fotoprotectora	19
I.	Estimación del factor de protección solar del extracto en PEG y las formulaciones de <i>L. medicinalis</i>	19
13)	Desarrollo de modelo de piel sintética	20
14)	Evaluación cualitativa de la fotoprotección	22

4.	Resultados y discusiones	24
1)	Identificación taxonómica	24
2)	Procesamiento del material y análisis de partículas	24
3)	Preparación del extracto en PEG de <i>L. medicinalis</i>	26
4)	Caracterización física del extracto.....	26
I.	Características organolépticas.	26
II.	Densidad, viscosidad relativa y pH	27
5)	Tamizaje fitoquímico	27
6)	Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu.....	39
7)	Determinación del contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de $AlCl_3$	40
8)	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de <i>L. medicinalis</i>	41
I.	Tinción Gram.....	41
II.	Ensayo de difusión en agar	42
III.	Ensayo para determinar Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	43
9)	Determinación de la actividad antioxidante	46
I.	Método cualitativo	46
II.	Método cuantitativo DPPH	46
10)	Elaboración de formulación tópica con extracto en PEG de <i>L. medicinalis</i>	47
11)	Actividad fotoprotectora	49
I.	Estimación del factor de protección solar del extracto en PEG y las formulaciones de <i>L. medicinalis</i>	49
12)	Desarrollo de modelo de piel sintética	50
I.	Evaluación cualitativa de la fotoprotección.....	53
5.	Conclusión.....	56
6.	Bibliografía	57
7.	Anexos	68
1)	Absorbancias CPT	68
2)	Absorbancias CFT	70
3)	Absorbancias MIC.....	72

1. Introducción

El acné, también conocido como acné común o acné vulgaris, es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que afecta común y principalmente a personas entre 12 a 25 años, teniendo un coste no sólo económico por los tratamientos, sino que también uno psicológico, puesto que se ha observado una mayor prevalencia de depresión y/o ansiedad en individuos que la padecen [1].

Esta enfermedad se caracteriza por afectar a los folículos pilosebáceos (Figura 1), los cuales son estructuras anatómicas de la piel constituidos por tres componentes interrelacionados: el folículo piloso, conducto desde el cual crecen las fibras capilares gracias a los queratinocitos; la glándula sebácea, compuesta por sebocitos y responsable de la secreción de la sustancia oleosa que lubrica y protege la piel denominada “sebo”; y el músculo piloerector, pequeño músculo liso capaz de contraerse y hacer que el cabello se erice. A pesar de tener estas estructuras distribuidas a lo largo de todo el cuerpo, con excepción de las palmas de las manos y las plantas de los pies, el acné suele concentrarse en las zonas del rostro, pecho y espalda debido a la alta concentración de glándulas sebáceas en estas porciones de la piel. Si bien, es de amplio conocimiento que el desarrollo de esta condición cutánea es multifactorial, su etiopatogenia reside primeramente en el efecto estimulante que tienen las hormonas androgénicas sobre los folículos pilosebáceos. Los andrógenos son los que estimulan el crecimiento y desarrollo de estas estructuras en la pubertad, y luego los que propician la proliferación de los queratinocitos, sebocitos y las células epiteliales escamosas presentes en estas unidades cuando ya están desarrolladas [2][3].

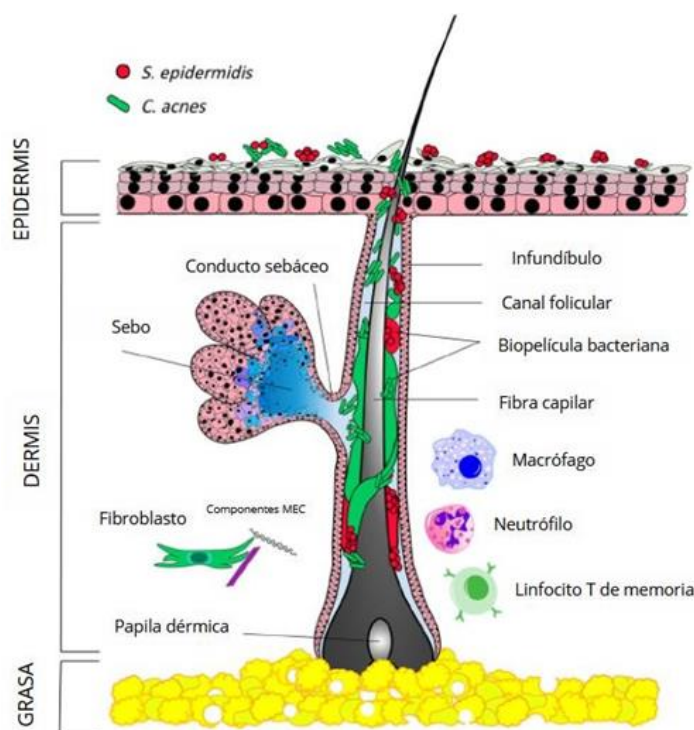


Figura 1. Representación de la organización de la piel y el folículo pilosebáceo. Las principales bacterias interactuando y coexistiendo son *C. acnes* y *S. epidermidis*.

Al presentar acné, hay una sobreestimulación de los receptores androgénicos presentes en los folículos pilosebáceos, ya sea por un desbalance hormonal o sensibilidad de los receptores, lo que conlleva como consecuencia a una producción elevada de sebo (hiperseborrea) y a un aumento del recambio celular de los queratinocitos. La lesión acnéica se produce cuando dichas células muertas no son capaces de salir del infundíbulo del folículo (la apertura hacia la superficie de la piel) y forman un tapón, obstruyendo el transporte de sebo, queratinocitos y productos de desecho a la capa más externa de la piel. El tapón formado no impide que se siga produciendo sebo y el crecimiento del cabello bajo este, lo que desencadena que se acumule y ejerza presión mecánica en la unidad pilosebácea. La presión generada por esta acumulación de productos compromete la disponibilidad de oxígeno para las células que componen esta estructura, restringiendo su metabolismo y propiciando un ambiente ideal para que los microorganismos comúnmente encontrados en la piel colonicen los folículos [2][3]. En el caso de las bacterias, estas corresponden principalmente a *Cutibacterium acnes*, aunque también se han encontrado *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* siendo parte de la microbiota normal de la piel, todas bacterias grampositivas anaerobias [5].

En el acné toma especial importancia *C. acnes*, puesto a que se ha observado que en pacientes con esta condición se produce una disbiosis de los diferentes filotipos identificados de esta bacteria en la superficie cutánea. Esto es debido a que las condiciones anaeróbicas y rica en lípidos del folículo pilosebáceo promueven la proliferación selectiva del filotipo IA-1, cepa con el potencial y virulencia para desencadenar y exacerbar la respuesta inflamatoria. La presencia de estas bacterias y sus productos como enzimas lipasas, proteínas proinflamatorias y ácidos grasos liberados por la degradación de sebo son capaces de activar la respuesta inmune innata del organismo, induciendo la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) y la interacción con receptores tipo Toll (TLRs) en queratinocitos, sebocitos y células inmunes residentes de la piel. Esta interacción activa la cascada de señalización que estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-8, TNF- α y IL-6. Quimioquinas, como IL-8, atraen a neutrófilos que se encargan de fagocitar bacterias y restos celulares, produciendo la gran cantidad de material muerto que forma lo que se reconoce como “pus” en las diferentes lesiones causadas por el acné [5, 6, 7].

Debido a que los procesos para el desarrollo del acné son diversos, es posible que se produzcan diferentes lesiones cutáneas en el mismo individuo, las que se pueden clasificar como “lesiones por retención” (comedones abiertos y cerrados) o “lesiones inflamatorias” (pápulas, pústulas, nódulos y quistes) [8]. Según la cantidad y el tipo de lesiones presentes en la superficie cutánea del paciente también se puede clasificar el acné en “no inflamatorio” e “inflamatorio” con diferentes severidades. La clasificación resulta de suma importancia para poder elegir correctamente una terapia farmacológica según las necesidades de cada individuo (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del acné según severidad y tratamiento recomendado a seguir [9].

Tipo de acné	Características	Tratamiento
No inflamatorio	Solo comedones	Comedolíticos tópicos o peróxido de benzoilo
Inflamatorio leve	Comedones y escasa cantidad de pápulas y pústulas	Comedolíticos tópicos y/o antibióticos tópicos
Inflamatorio moderado	Comedones y muchas pápulas y pústulas. Puede haber algún quiste	Comedolítico tópico y antibiótico vía oral
Inflamatorio severo	Además de comedones, pápulas y pústulas, aparecen nódulos y/o quistes	Tratamiento sistémico con retinoides orales

Dentro de los tratamientos que existen actualmente es posible encontrar diversas opciones, tanto medicamentosas como cosméticas. Dentro de lo que a medicamentos refiere, existen los retinoides tópicos, que son derivados de la vitamina A usados como monoterapia en el acné leve, y de mantenimiento en el moderado y severo. Los más utilizados son Tretinoína, por su capacidad de regular la descamación del epitelio del folículo pilosebáceo evitando que se obstruya, y Adapaleno, que normaliza la diferenciación celular del mismo epitelio, previniendo la formación de comedones, además de que ambos tienen actividad antiinflamatoria [10]. A pesar de ser ampliamente empleados como terapia, no son bien tolerados, sobre todo en personas con la piel más sensible debido a que causan efectos secundarios como fotosensibilidad, irritación cutánea, sensación de quemazón, sequedad y enrojecimiento de la piel, o en casos más graves quemaduras [11].

Otra opción son los antibióticos tópicos. Los más utilizados para el acné vulgaris son Eritromicina y Clindamicina, puesto que son capaces de reducir las colonias de *C. acnes* en la superficie de la piel y dentro de los folículos pilosebáceos [10]. A pesar de ser una terapia efectiva, la principal desventaja que presentan es que no pueden ser usados como monoterapia por un tiempo muy prolongado, debido a que las bacterias desarrollan resistencia a estos antibióticos rápidamente. Para intentar evitar este problema y aumentar la eficacia del tratamiento, suelen administrarse en combinación con peróxido de benzoilo, un bactericida no selectivo con actividad contra *C. acnes* y adicionalmente con efecto queratolítico que evita la formación de comedones. Por su efecto puede utilizarse como monoterapia en acné leve un tiempo acotado, pero su aplicación tiene efectos secundarios como irritación en la piel, picor, quemazón, sequedad, enrojecimiento y fotosensibilidad, lo que vuelve a la piel más sensible a quemaduras y daño cutáneo [11].

También se utilizan antibióticos orales como Eritromicina, Doxiciclina, Minociclina o Tetraciclina para acné moderado y severo, debido a que son capaces de inhibir la

proliferación de *C. acnes* y con ello las moléculas proinflamatorias que liberan estas bacterias. Sin embargo, al igual que con los antibióticos tópicos, pueden desarrollar resistencia fácilmente por su uso prolongado a bajas dosis. Para evitarlo también, se recomienda administrarlos en conjunto con peróxido de benzoilo o retinoides tópicos, pero su uso también genera fotosensibilidad en el usuario y que otras bacterias desarrollen resistencia [10, 11].

Adicionalmente, existe la opción de tratamiento con Isotretinoína, un retinoide oral usado como tratamiento de primera línea en acné severo y recalcitrante. Actúa disminuyendo la producción de sebo, alterando el ecosistema cutáneo y reduciendo la colonización de *C. acnes*, además de estimular el recambio celular en los queratinocitos [10]. Si bien, es una buena opción terapéutica, es embriotóxico y teratogénico, por lo que su uso debe ser evaluado caso a caso. Sumado a esto, tiene un amplio historial de efectos secundarios que incluyen sequedad e irritación de la piel, irritación de la conjuntiva, resequedad de mucosas en boca, vagina y faringe, y fotosensibilidad. Incluso se han registrado efectos de depresión en algunos pacientes [11].

Por otro lado, a lo que tratamientos cosméticos refiere, se encuentra el ácido salicílico tópico, disponible en variadas formas cosméticas como jabones o crema. Este es un compuesto con propiedades comedolíticas, queratolíticas y antiinflamatorias, puesto que su efecto principal consiste en disolver uniones celulares entre queratinocitos del estrato córneo, facilitando la exfoliación de esta capa de la piel y evitando obstrucción folicular. Entre los efectos adversos más comunes se incluyen irritación local, eritema, sequedad, descamación y sensación de ardor, especialmente en pieles sensibles o al usar concentraciones más altas [12]. Continuando con otro tratamiento tópico, se encuentra el ácido azelaico, el que posee actividad antimicrobiana contra *C. acnes* y *S. epidermidis* [13], efecto queratolítico y comedolítico ya que normaliza la diferenciación y proliferación de queratinocitos, y además tiene propiedades antiinflamatorias. Aunque su perfil de tolerancia es generalmente bueno al ser aplicado como crema o sérum, el ácido azelaico puede provocar irritación local leve, incluyendo enrojecimiento, picor, quemazón, escozor o sequedad, especialmente durante las primeras semanas de uso o con concentraciones elevadas [14].

Otro compuesto utilizado es el ácido glicólico, en forma de crema, serum o tónico, debido a que su mecanismo de acción principal consiste en disminuir la cohesión de los queratinocitos del estrato córneo, promoviendo una exfoliación controlada y acelerando la renovación epidérmica, lo que reduce la formación de microcomedones y mejora la textura de la piel. Los efectos adversos más frecuentes incluyen irritación, eritema, descamación, escozor y fotosensibilidad, especialmente al iniciar el tratamiento o cuando se utilizan concentraciones superiores al 10 % en pieles sensibles [15]. Asimismo, también se usa el retinol, un compuesto derivado de la vitamina A que promueve una normalización de la queratinización folicular, inhibición de la formación de microcomedones y aumento del recambio epidérmico [16] además de ser capaz de modular la respuesta inmune innata frente a *C. acnes*. Sin embargo, su uso no está exento de reacciones adversas. El retinol

puede inducir una "dermatitis retinoide" caracterizada por eritema, descamación, ardor, sequedad, prurito y fotosensibilidad, especialmente durante las primeras semanas de tratamiento, cuando la piel aún no ha desarrollado tolerancia. Además, es común observar una fase inicial de purga, en la que pueden emerger lesiones preexistentes en desarrollo, fenómeno transitorio que usualmente remite en cuatro a seis semanas [17].

Debido a las notables desventajas que tiene cada uno de los fármacos y cosméticos que se usan comúnmente es que resulta necesario buscar un nuevo enfoque en el tratamiento del acné. Se ha vuelto importante la búsqueda de moléculas que puedan actuar sobre más de uno de los factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad y que, además, tengan muy pocos o incluso nulos efectos secundarios sobre las personas que las utilicen.

En esta búsqueda surge como opción el uso de plantas medicinales, puesto que han sido utilizadas históricamente y ampliamente por la población debido a los diferentes compuestos químicos farmacológicamente activos que presentan. Este tipo de compuestos, conocidos como metabolitos secundarios, se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides, los que tienen diferentes efectos que incluyen actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral, antiviral, y otras dependiendo de su estructura y sinergismo entre compuestos [18, 19].

En Chile, en el año 2010, se entregó una guía titulada "Listado de Medicamentos Herbarios Tradicionales", en que se listan 103 especies vegetales utilizadas popularmente por la población chilena como terapia. En el listado se nombran las especies con su nombre científico, nombre común, una monografía para reconocer la planta, sus propiedades terapéuticas con o sin respaldo científico y la manera de administrarlas. Incluye plantas de 59 familias diferentes, dentro de las cuales destacan las Asteraceae, Lamiaceae, Fabaceae, Rosaceae y Verbenaceae [20]. En este contexto, la familia Verbenaceae toma relevancia, puesto que está ampliamente distribuida en el mundo, y en Chile se distribuye en varias zonas del país, pero concentradas principalmente en la zona norte [21], donde se encuentran especies tales como el Cedrón (*Aloysia citriodora*), Lampayo (*Lampayo medicinalis*), Rica-Rica (*Acantholippia deserticola*), Verbena (*Verbenalittoralis*), entre otras, en las que se ha documentado compuestos con actividad antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, y más diversos efectos biológicos [22, 23, 24, 25]

Es por eso que, una de las especies que podría ser candidata como agente antiacné es *Lampayo medicinalis*, conocida comúnmente como lampayo o lampaya (Figura 2). Es un arbusto endémico de Chile, el cual se puede encontrar exclusivamente en el altiplano de la región norte del país, debido a que sus condiciones para crecer requieren de una altitud elevada, aridez extrema y exposición directa al sol sin protección [26]. Las hojas de esta especie son utilizadas en forma de infusión en la medicina tradicional para tratar diferentes afecciones como dolor en los huesos, problemas en la próstata, afecciones renales y de las vías urinarias, y en trastornos hepáticos y de las vías biliares [20].



Figura 2. Foto de la especie *Lampayo medicinalis* tomada en el sector de Ollagüe, Región de Antofagasta. Autora: Waleska Vera.

Gracias a Morales, G. & Paredes, A. [23], se conocen los principales compuestos químicos presentes en un extracto de alta polaridad de la especie, lo que puede orientar a los posibles efectos que tiene esta planta en el organismo, además de los documentados por el uso tradicional (Tabla 2).

Tabla 2. Principales metabolitos identificados en una partición de acetato de etilo del extracto hidroalcohólico de *L. medicinalis* [23] y efectos biológicos documentados.

Compuesto	Efecto biológico
5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	Antiinflamatorio [27], antibacteriano [28]
5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona	Antimelanogénico [29]
velutina	Antimelanogénico [30], antiinflamatorio [31], antibacteriano [32]
cirsilineol	Antiinflamatorio [33], antibacteriano [34]
piceol	Antiinflamatorio [35]
piceina	Antioxidante [36]
genipín	Antiinflamatorio [37], antibacteriano [38]

Respecto a ello, la actividad antiinflamatoria, antioxidante y hepatoprotectora de extractos de *L. medicinalis* ha sido respaldada en diversos trabajos experimentales [23, 39, 40, 41, 42], y, adicionalmente, como se puede observar en la Tabla 2, diversos trabajos también han documentado que los metabolitos aislados presentes en *L. medicinalis*, los que

corresponden principalmente a polifenoles y flavonoides [23, 40], tienen actividad biológica que podría posicionar a esta especie como un potencial agente antiacné, principalmente si se utiliza un extracto total de la especie, debido al sinergismo que suelen tener los metabolitos secundarios entre ellos. Esto, debido a que estos compuestos al ser probados de manera aislada han demostrado actividad antibacteriana contra una variedad de bacterias Gram positivas y negativas [28, 32, 34, 38] que, si bien no ha sido sobre las bacterias específicas del acné, es un indicativo de que esta planta podría tener efecto sobre las cepas *C. acnes*, *S. aureus* y *S. epidermidis* que colonizan al folículo pilosebáceo, atacando a la enfermedad desde ese eje.

Por otra parte, la mayoría de estas moléculas tiene actividad antiinflamatoria, que es una de las aristas principales a tratar en pacientes con esta patología debido a que reducir la inflamación puede acelerar la resolución de las lesiones, hacer que duren menos y prevenir la aparición de nuevas, además de minimizar el daño en la piel y el riesgo de cicatrización. Adicionalmente, se puede observar que incluso hay metabolitos con capacidad antimelanogénica, lo que resulta una propiedad bastante atractiva para ayudar a mejorar el aspecto del cutis, ya que en el acné se produce un efecto denominado “hiperpigmentación post-inflamatoria (HPI)”, en el cual los mediadores proinflamatorios estimulan la sobreproducción de melanina por parte de los melanocitos, depositando este pigmento en las lesiones del acné, manchando la piel [43].

Asimismo, si se consideran los estudios realizados a la planta *L. medicinalis*, esta ha demostrado una fuerte acción antioxidante en extractos de polaridad alta [23], lo que podría ser otro eje de tratamiento para el acné, debido a que esta condición está asociada con un aumento en la producción de radicales libres que aportan a la inflamación y al daño en las células del folículo pilosebáceo. Los antioxidantes actúan neutralizando los radicales libres, reduciendo el estrés oxidativo, la inflamación y el daño celular en la piel [44]. También está documentado que la planta es capaz de inhibir eficazmente procesos inflamatorios agudos en un modelo murino a dosis desde los 37,5 mg en un extracto hidroalcohólico [42].

Sumado a esto, un factor importante para considerar a *L. medicinalis* como un agente antiacné, es que además de poseer todas las actividades biológicas mencionadas, está comprobado que tiene un índice de protección solar (FPS) de 10,7 [45]. La fotoprotección es vital en el día a día porque protege de la radiación ultravioleta (UV) irradiada por el sol y sus diferentes tipos, como la UVB, que es capaz de penetrar la capa más externa de la piel y producir quemaduras e incluso melanoma si es que la persona se expone en exceso a la luz solar, y la UVA, capaz de penetrar capas más profundas de la piel, aportar al envejecimiento y agravar las quemaduras producidas por la UVB [46]. Si bien este factor no es un valor muy alto a comparación de la mayoría de los protectores solares disponibles comercialmente, y al contrario de las opciones antiacné disponibles que han sido descritas, un producto derivado de lampayo en vez de producir fotosensibilidad estaría protegiendo la piel de la persona que lo utilice, debido a que tiene compuestos de los que se tiene reporte como fotoprotectores, como los polifenoles, que son capaces de absorber energía en la

región UV y dispersarla en forma de calor o fluorescencia, protegiendo a la piel del daño solar [47].

Para investigar el potencial de *L. medicinalis* como ingrediente antiacné y fotoprotector, se utilizará como solvente polietilenglicol (PEG) de bajo peso molecular para extraer los metabolitos. Esto debido a que el PEG es denominado un “biosolvente”, por ser poco tóxico, no volátil y biodegradable, lo que lo hace seguro tanto para el ambiente como para quien lo utilice. El PEG, específicamente el PEG 400, también surge como una opción debido a que químicamente es un solvente polar, pero en su estructura tiene una cadena larga de tipo etoxilada ($\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{O—}$) lo que le confiere una zona polar (los grupos —OH terminales) y una zona levemente lipofílica (la cadena etoxilada). Su estructura permite que se comporte como un solvente anfifílico ideal para extraer una amplia diversidad de compuestos polares como flavonoides y polifenoles, y en menor medida, otros no tan polares como terpenoides [48, 49, 50]

Es en base a todos estos antecedentes que surge la pregunta: ¿*Lampayo medicinalis* tiene potencial como ingrediente cosmético antiacné y fotoprotector?; Puesto que, gracias a la diversidad de sus metabolitos, se podría desarrollar una formulación tópica con el extracto de esta planta, para obtener el efecto antibacteriano, antiinflamatorio y antioxidante en las zonas afectadas por el acné donde se aplique, como rostro o cuello.

Para caracterizar el extracto, se realizará un tamizaje fitoquímico para identificar los diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto, además del método Folin-Ciocalteu y AlCl_3 para cuantificar el contenido total de polifenoles y flavonoides. Adicionalmente, se medirá la actividad antimicrobiana del extracto con el ensayo de difusión en agar, para identificar si es que la planta es capaz de inhibir las bacterias presentes en el acné, y el ensayo en microplaca para concentración mínima inhibitoria (MIC), para poder establecer la dosis de la formulación y la concentración del extracto en el producto final. Finalmente, se calculará el factor de protección solar (FPS) usando la ecuación de Mansur al extracto y se probará su capacidad como fotoprotector, y su interacción con la piel en general, utilizando tarjetas de prueba ultravioleta (UV) y un modelo de piel desarrollado *in vitro*, en consecuencia de la Ley 21.646 promulgada en Chile que prohíbe el uso de animales para pruebas de seguridad y eficacia, y del principio de las tres erre (3R) en la experimentación con seres vivos, que habla sobre Reducir al mínimo la cantidad de animales, Refinar los procedimientos para minimizar el sufrimiento animal, y siempre Reemplazar por técnicas alternativas si existe la opción.

2. Objetivos

1) Objetivo general

Formular un gel cosmético con propiedades antimicrobianas y fotoprotectoras para el tratamiento del acné basado en un extracto en PEG de hojas de *Lampayo medicinalis*.

2) Objetivos específicos

1. Caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto *L. medicinalis* mediante tamizaje fitoquímico y cuantificar la concentración de flavonoides y polifenoles totales mediante técnicas espectrofotométricas.
2. Determinar la actividad antimicrobiana, la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la actividad antioxidante del extracto de *L. medicinalis*.
3. Elaborar un gel cosmético como vehículo compatible para el extracto de *L. medicinalis*.
4. Estimar el factor de protección solar (FPS) del extracto de *L. medicinalis* y de la formulación final.
5. Diseñar un modelo de piel sintética de antebrazo para medir humedad, elasticidad y protección ultravioleta (UV) al aplicar la formulación final.

3. Metodología

1) Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el norte de Chile, camino a la localidad de Río Grande (22°40'08.4"S 68°18'30.5"W), en las cercanías de la ciudad de San Pedro de Atacama. La recolección se llevó a cabo durante el mes de diciembre de 2024. Luego, lo recolectado se trasladó al Laboratorio de Química de Metabolitos Bioactivos de la Universidad de Valparaíso (LAQUIMEB), protegido tanto de la luz, como de la humedad y la temperatura.

2) Identificación taxonómica

El material botánico (hojas de lampayo) fue identificado taxonómicamente mediante comparación con el espécimen, voucher VALPL_PLV:2283, del herbario VALPL de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Playa Ancha. Esto se realizó mediante el método de Schultze [51] por la botánica Mg. Pamela Ramírez, curadora del herbario.

3) Procesamiento del material y análisis de partículas

En el laboratorio, el material vegetal fue lavado con abundante agua potable para poder eliminar cualquier resto de tierra, insectos u otras especies vegetales, y se dejó secar por una semana a temperatura ambiente protegido de la luz del sol. Cuando el material estuvo seco, se separaron manualmente las hojas de los tallos. Las hojas fueron trituradas con un molinillo (Sukaldari multifunction desintegrator). El polvo resultante fue tamizado con un tamiz N°45, con un mesh de 355 micrones, para obtener un tamaño medio de partícula (D50) homogéneo.

Para verificar el tamaño de partícula y la distribución del tamaño de estas, se tomó una muestra del polvo y se analizó en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valparaíso, mediante difracción láser, haciendo uso del equipo HELOS BR/RODOS (Sympatec®) con sistema de dispersión seca y análisis a través del software PAQXOS 6.0. El equipo fue operado a 2 bar como presión de dispersión, usando el lente R5 para amplio rango de tamaño de partícula (1-850 μm).

4) Preparación del extracto en PEG de *L. medicinalis*

Para preparar el extracto se adaptó la metodología de Šuran, J. [49], por lo que se utilizaron 20 g de polvo fino de lampayo, los que fueron macerados en 100 mL de PEG (Kollisolv® PEG 400, BASF Pharma). Se prepararon dos extractos, uno que fue macerado durante tres días (L3D) con agitación constante en un agitador magnético (Magnetic Stirrer SH-2), a temperatura ambiente y protegido de la luz, y uno que fue macerado durante tres meses (L3M), en refrigeración para evitar degradación de los compuestos y con agitación periódica. Una vez finalizado el tiempo de maceración, las mezclas se filtraron por gravedad utilizando un papel filtro Whatman N°2 y una malla de nylon mesh 400. Los extractos obtenidos se masaron y se almacenaron a 4°C, protegidos de la luz. Finalmente, se determinaron los porcentajes de rendimiento del extracto mediante la ecuación 1:

$$\% \text{ Rendimiento } p/p = \frac{(\text{Masa extracto filtrado (g)})}{(\text{Masa solvente inicial (g)})} \times 100$$

5) Caracterización física del extracto

I. Propiedades organolépticas

Se registraron las características de color, olor, y textura de los extractos.

II. Densidad

Se utilizó el método de picnómetros de vidrio, en el cual se masó el picnómetro vacío (m_1), con los extractos (m_2) y con agua destilada (m_3) en una balanza analítica (Boeco BAS31). Para calcular la densidad se determinó el volumen del picnómetro con la ecuación 2:

$$V = \frac{(m_3 - m_1)}{\text{Densidad del agua a la } T^\circ \text{ de trabajo}}$$

Con el volumen del picnómetro conocido se calculó la densidad con la ecuación 3:

$$\text{Densidad del extracto} = \frac{(m_2 - m_1)}{V}$$

III. Viscosidad relativa

La viscosidad relativa de ambos extractos, L3D y L3M, se determinó utilizando un viscosímetro rotacional de Brookfield (Modelo BHT) con adaptador de pequeña muestra con el husillo N°29, a una velocidad de 50 rpm y una temperatura de 25°C. La muestra utilizada tenía un volumen cercano a los 7 mL.

IV. pH

La determinación de pH de los extractos se realizó diluyendo estos en agua destilada a una concentración de 100 mg/mL, y se utilizó un pHmetro calibrado previamente con soluciones buffer a pH 4,00 y 7,00 para una lectura precisa.

6) Tamizaje fitoquímico

En la unidad de investigación I se propuso un análisis por HPLC-MS/MS que permitiría caracterizar y cuantificar la composición química del extracto PEG de lampayo. Sin embargo, la continua búsqueda bibliográfica, nos hizo decidir no utilizar esta técnica. Esto debido a la naturaleza de este solvente en cuanto a su alta capacidad de ionización, lo que sería un interferente en el análisis, debido a que sólo se observarían señales de PEG en el espectro. A raíz de ello, se propuso realizar un tamizaje (screening) fitoquímico que permite analizar e identificar cualitativamente los principales grupos de compuestos presentes en este extracto vegetal.

El tamizaje fitoquímico se realizó con un alícuota líquida de cada extracto (aproximadamente dos gotas) y en triplicado en tubos de ensayo, con el objetivo de obtener resultados con mayor validez. Se consideró la reacción como positiva cuando se detectó la

aparición de color, precipitado, espuma o fluorescencia (la cual fue determinada usando una lámpara UV a una longitud de onda de 365 nm). Los ensayos para identificar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios se pueden resumir en la Tabla 3:

Tabla 3. Metabolitos a detectar y las respectivas pruebas para realizarlo.

Metabolito secundario	Ensayo	Resultado positivo
Alcaloides [52, 53]	Hager	Precipitado sólido amarillo
	Mayer	Turbidez o precipitado amarillo
	Wagner	Precipitado marrón rojizo
	Dragendorff	Precipitado sólido rojo
Saponinas [52]	Espuma	Espuma > 5 mm
Terpenos	Libermann-Burchardt [52, 53, 54]	Color rosa a morado
Triterpenos		Verde
Fitoesteroles		
Triterpenos	Salkowski [52]	Amarillo
Fitoesteroles		Rojo en capa inferior
Terpenoides [55]	Cloroformo y ácido sulfúrico concentrado	Coloración café
Taninos [52]	Cloruro férrico (FeCl ₃) 12,5%	Hidrolizables: Azul completo Condensados: Verde oscuro
Flavonoides	Cloruro de aluminio (AlCl ₃) 3% [55]	Florescencia verde
	Shinoda [52]	Naranja, rojo, rosa, azul o violeta
Glucósidos [53]	Fehling	Coloración o precipitado rojo
Cumarinas [52]	Fluorescencia	Florescencia azul-celeste
Quinonas [52]	Quinonas	Coloración roja

Cada uno de los ensayos se realizó siguiendo su respectivo procedimiento, los cuales se desglosan a continuación:

Alcaloides: Se añadieron 2 mL de ácido clorhídrico 37% (HCl) a cada muestra y se llevaron a un baño ultrasonido por 15 minutos a 40°C. Pasado el tiempo, se filtraron con papel filtro y luego con una pirinola de 0,22 µm, para que las muestras quedaran lo más transparente posible. Una vez listo, se tomó una alícuota de cada filtrado para cada ensayo y se agregaron 20 gotas de cada uno de los reactivos para alcaloides: Hager, Mayer, Wagner y Dragendorff en cada uno de los tubos de ensayo correspondientes. Se consideraron positivas las pruebas en las que apareció un precipitado (ver Tabla 3).

Saponinas: Se diluyeron dos gotas de cada extracto en 5 mL de agua destilada en tubos de ensayo y se agitaron manualmente de forma vigorosa durante 30 segundos y se dejó reposar durante 15 minutos posterior a la agitación. Se consideró como positiva la prueba cuando la altura de la espuma formada fue mayor a 5 mm, y además persistió pasado el tiempo de reposo.

Terpenos, Triterpenos y Fitoesteroles: Para el ensayo de Libermann-Burchardt (LB), se disolvió una alícuota de cada muestra en 10 mL de cloroformo. Posteriormente se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior, se agregaron 0,25 mL de anhídrido acético por las paredes de los tubos de ensayo y, por último, se añadió 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró positiva la prueba cuando hubo formación de color verde, que indica la presencia de fitoesteroles, y/o rosa a morado, que indica la presencia de terpenos y triterpenos.

Para el ensayo de Salkowski, se disolvió una alícuota de cada muestra en 10 mL de cloroformo. Posteriormente se filtraron las soluciones y se agregaron tres gotas de ácido sulfúrico concentrado, se agitaron y mantuvieron en reposo. Se consideró como positiva la prueba cuando se observó la formación de color amarillo, que indica la presencia de triterpenos, y/o la formación de color rojo en la capa inferior del tubo de ensayo, que indica la presencia de fitoesteroles.

Terpenoides: Se tomó una alícuota líquida de cada muestra y se les agregó 1 mL de cloroformo a cada uno de los tubos de ensayo. Posteriormente se les agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se consideró la prueba como positiva cuando se observó una coloración café.

Taninos: Se tomó una alícuota de cada muestra y se agregaron 3 gotas de cloruro férrico al 12,5%. Se consideró como positiva la prueba para taninos hidrolizables cuando se observó formación de color azul, y cuando hubo formación de color verde oscuro para taninos condensados.

Flavonoides: Para el ensayo con cloruro de aluminio al 3%, se disolvió una alícuota para cada muestra en 1 mL de metanol. Posteriormente, se sembraron 10 µL de cada solución en tiras de papel filtro, los que fueron pulverizados con una solución de cloruro de aluminio al 3%. Se consideró como positiva la prueba cuando se observó fluorescencia verde en el papel filtro al observar bajo la luz UV a 365 nm.

Para el ensayo de Shinoda, se diluyó una alícuota de cada muestra en 1 mL de agua destilada en tubos de ensayo y se les agregó un pedazo de viruta de magnesio. Después, se calentaron los tubos hasta los 60°C y se adicionó HCl concentrado por las paredes de los tubos de ensayo. Se consideró como resultado positivo cuando apareció una coloración naranja, rojo, rosa, azul o violeta.

Glucósidos: Se tomó una alícuota de cada muestra y se les agregaron 2 mL de solución de Fehling A ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 2 mL de solución de Fehling B ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$). Después, se llevaron los tubos a un baño termorregulado a 80°C por 3 minutos. Una vez pasado el tiempo, se sacaron los tubos del baño y se dejaron reposar 20 minutos. Se consideró como positiva la prueba cuando apareció una coloración roja o precipitado rojo.

Cumarinas: Se tomó una alícuota de cada muestra y se disolvieron en 1 mL de agua hirviendo en tubos de ensayo. Se cubrió la boca de cada tubo con papel filtro empapado en una solución de hidróxido de sodio 1N. Después, se llevaron los tubos a un baño termorregulado a 100°C por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se esperó a que se enfriaran hasta temperatura ambiente, y el papel filtro frío se expuso a luz UV a 365 nm. Se consideró como positiva la prueba cuando se observó fluorescencia azul-celeste.

Quinonas: Se tomó una alícuota de cada muestra y se agregaron 2 mL de una solución 1:1 – agua destilada:metanol. Posteriormente se agregaron 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró como positiva la prueba cuando se observó la formación de una coloración roja.

7) Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu

La determinación de polifenoles totales (CPT) del extracto en PEG de *L. medicinalis* se hizo a través del método de Folin-Ciocalteu, el que tiene su fundamento en la capacidad de los polifenoles de reducir el reactivo de Folin de Mo (IV), que tiene una coloración amarilla, a Mo (V), que adquiere una coloración azul la que puede ser medida con espectrofotómetro para cuantificar la cantidad de polifenoles en el extracto [56].

Para determinar el CPT se construyó una curva de calibrado con una solución patrón acuosa de ácido gálico de concentración 500 µg/mL. A partir de esta, se prepararon soluciones de concentración 20, 30, 40, 50, 60 y 70 µg/mL, que fueron las concentraciones con las que se construyó la curva. Se tomaron 100 µL de cada solución y se depositaron en tubos Eppendorf ámbar. A estos se les adicionó 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu en oscuridad (en un periodo de 2 minutos) y se les agregó 800 µL de carbonato de sodio al 5% p/v (acuoso). Los tubos con cada punto de la curva se agitaron manualmente y se colocaron en un baño ultrasonido por 20 minutos a 40°C. Para construir la curva se preparó un blanco con 100 µL de agua, 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y 800 µL de carbonato de sodio al 5% p/v.

Para determinar el CPT de los extractos en PEG de *L. medicinalis*, se diluyó una alícuota de cada uno en agua destilada para obtener soluciones de concentración 6 mg/mL

(concentración determinada experimentalmente) y se les dio el mismo tratamiento que a los puntos de la curva de calibrado.

La medición de los puntos de la curva de calibrado, así como de la muestra del extracto de *L. medicinalis*, se realizó en un espectrofotómetro (ZUZI Spectrophotometer Model 4201/50), en triplicado, a una longitud de onda de 740 nm. El contenido de compuestos fenólicos presentes en la muestra se extrapoló del promedio de las curvas de calibrado del ácido gálico. El CPT se expresó como mg EAG/mL (miligramos de equivalentes de ácido

8) Determinación del contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de AlCl_3

La determinación del contenido de flavonoides totales (CFT) del extracto en PEG de *L. medicinalis* se determinó por el método colorimétrico con AlCl_3 . El fundamento de este recae en que el ion aluminio es capaz de formar un complejo coloreado con los grupos carbonilo e hidroxilo presentes en flavonoles y flavonas [57]. Primero, se construyó una curva de calibrado con una solución patrón acuosa de quercetina de concentración 200 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta, se prepararon soluciones de concentración 20, 40, 80, 100, 150 y 180 $\mu\text{g/mL}$, que fueron las concentraciones con las que se construyó la curva. Se tomaron 30 μL de cada solución y se les adicionó 10 μL de AlCl_3 al 10%, 10 μL de acetato de sodio 1M y se completó con 250 μL de agua. Para construir la curva se preparó un blanco con 10 μL de AlCl_3 al 10%, 10 μL de acetato de sodio 1M y 280 μL de agua. Para determinar el CFT de los extractos en PEG de *L. medicinalis*, según la metodología de Castillo & Vera [58], se preparó una solución acuosa de concentración 40 mg/mL, la que se fue determinada en la práctica.

Para medir la absorbancia, se rellenaron los pocillos de una microplaca de 96 pocillos en el siguiente orden: 30 μL del extracto o punto de la curva, 10 μL de AlCl_3 , 10 μL acetato de sodio 1 M y 250 μL de agua ($fd=10$). Esto se dejó reaccionando protegido de la luz por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia contra el blanco del ensayo, lo que se realizó por triplicado en un lector de multiplaca (confirmar marca y modelo), a 465 nm. La cantidad de flavonoides totales presentes en la muestra se extrapoló del promedio de la curva de calibrado de quercetina y se expresó como mg EQ/mL (miligramos equivalentes de quercetina por mililitros de extracto en PEG de *L. medicinalis*).

9) Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de *L. medicinalis*

La determinación de la actividad antimicrobiana de *L. medicinalis* se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales, en la Facultad de Medicina de la Universidad Diego Portales, en conjunto con la Dra. Jessica Bravo. Las cepas bacterianas que se utilizaron para las pruebas microbiológicas incluyeron las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Cutibacterium acnes* ATCC 11827, todas bacterias Gram positivas anaerobias. Para el ensayo de difusión en agar, se usaron placas de agar Mueller-Hinton (Merck©) con y sin sangre a 37°C para cultivar a *S. aureus* y *S. epidermidis*, y placas de agar Brucella (Merck©) a 37°C bajo una atmósfera

enriquecida con 10% de CO₂ para cultivar a *C. acnes*. Por otro lado, en el ensayo en microplaca para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), se usó medio de cultivo líquido Mueller-Hinton Broth (Merck©) para cultivar *S. aureus* y *S. epidermidis*, y medio de cultivo líquido Brucella Broth (Merck©) para *C. acnes*, con las mismas condiciones de incubación mencionadas anteriormente.

Antes de realizar los ensayos microbiológicos se tuvieron que hacer tinciones Gram (Coloración de Gram (Modificación de Hückler) Biopack®) de todas las bacterias que se cultivaron tanto en agar como en caldo, para confirmar morfológicamente que fueran efectivamente las bacterias de interés, y como estrategia para identificar si se produjo contaminación con otros microorganismos.

I. Tinción Gram

Para llevar a cabo la tinción de Gram, se esparcieron alícuotas de bacterias en portaobjetos con pocillos de 5 mm, y se fijaron a la superficie con calor. Una vez secos los portaobjetos, se procedió a realizar la tinción de Gram.

Primero, se añadió colorante cristal violeta a las bacterias fijadas, y después de 60 segundos se enjuagó el portaobjetos con agua para eliminar el exceso de colorante, y se sacudió el exceso de agua. Después, se añadió una solución de yodo para fijar el colorante a las bacterias, y después de 60 segundos, se enjuagó y sacudió el portaobjeto. Luego, se añadió una solución de etanol al 99% por 5 segundos para eliminar el exceso de colorante de las bacterias Gram positivas, y se enjuagó nuevamente con agua el portaobjeto por otros 5 segundos. Por último, se añadió safranina por 30 segundos para poder identificar la presencia o ausencia de bacterias Gram negativas en los cultivos. Una vez enjuagado y secado el portaobjeto, se examinó bajo microscopio. [59] Se utilizó un microscopio óptico (Motic BA210) para observar toda el área del portaobjeto con la tinción, con el objetivo x100 y su respectivo aceite de inmersión para una correcta observación.

II. Ensayo de difusión en agar

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos frente a las bacterias de interés, se llevó a cabo un ensayo de difusión en agar mediante siembra en superficie tipo césped en las placas, utilizando hisopos estériles. Las suspensiones bacterianas se prepararon ajustando su densidad a una absorbancia (OD) de 0,08 medida a 550 nm, correspondiente aproximadamente a una concentración de 1×10^8 UFC/mL, usando solución salina estéril. Para cada microorganismo se prepararon, por triplicado, las siguientes condiciones: control de crecimiento (sin tratamiento), sensidisco de eritromicina (15 µg), sensidisco de tetraciclina (30 µg), disco de papel filtro estéril de 5 mm impregnado con PEG (control de vehículo), disco impregnado con extracto L3D y disco impregnado con extracto L3M. En el caso de *S. aureus* y *S. epidermidis*, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C, mientras que las placas con *C. acnes* fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C bajo una atmósfera enriquecida con 10% de CO₂, dada su condición anaerobia facultativa. Al finalizar los periodos de incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición alrededor de los discos con la ayuda de un pie de metro, expresando los resultados en milímetros. Los datos

obtenidos de los extractos se compararon con los antibióticos de referencia utilizando la ecuación 4:

$$\text{Actividad relativa (\%)} = \frac{(\text{Halo de la muestra})}{(\text{Halo del control positivo})} \times 100$$

III. Ensayo para determinar Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos, L3D y L3M, y del antibiótico de referencia, tetraciclina, se realizó mediante el método de microdilución en caldo de cultivo en placas de 96 pocillos, siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Para ello, en los pocillos de la columna 2 a la 11 se depositaron 100 μL de medio de cultivo líquido con DMSO al 4% (v/v), mientras que el pocillo 12, correspondiente al control negativo (sin crecimiento bacteriano), se completó con 200 μL de medio de cultivo con DMSO al 2%. En el pocillo 1 se adicionaron 200 μL de extracto a una concentración inicial de 50 mg/mL disuelto en DMSO al 99%.

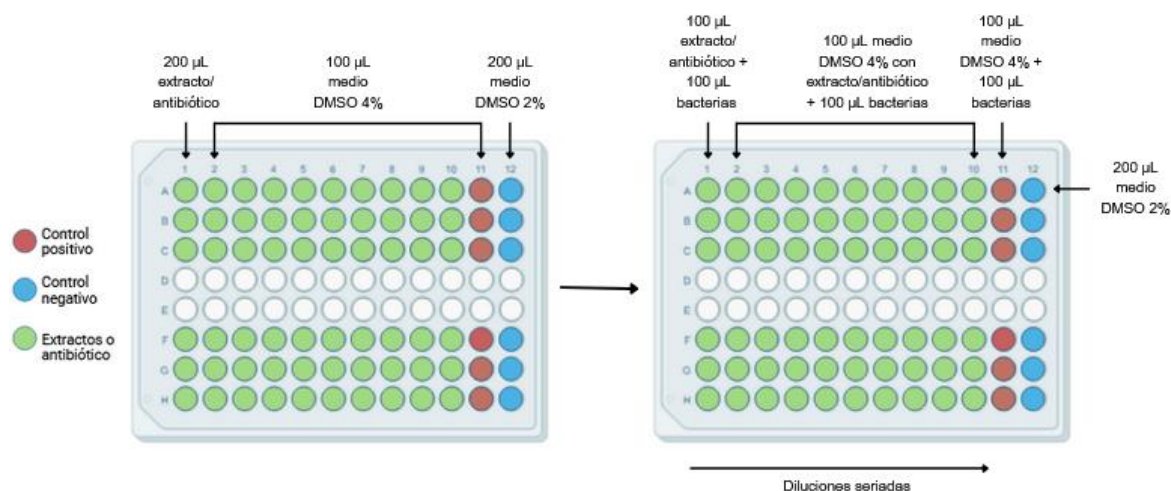


Figura 3. Condiciones experimentales previas y posteriores a las diluciones seriadas y la adición de las bacterias a evaluar para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Figura creada con BioRender.

A partir del pocillo 1, se realizaron diluciones seriadas decrecientes por un factor de 2, desde el pocillo 1 al 10, transfiriendo 100 μL de cada pocillo al siguiente y mezclando homogéneamente antes de cada transferencia, descartando finalmente los 100 μL tomados del pocillo 10. Posteriormente, se agregaron 100 μL de suspensión bacteriana fresca, equivalente a 1×10^8 bacterias/mL, a cada pocillo del 1 al 11 para completar un volumen final de 200 μL . El pocillo 11 actuó como control positivo de crecimiento bacteriano (sin extracto), y el ensayo se realizó por pseudotriplicado ($n=1$) para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. acnes*, incluyendo para cada cepa las siguientes condiciones experimentales: extracto L3D, extracto L3M y tetraciclina a 20 mg/mL. Las placas inoculadas fueron incubadas a 37 °C con agitación continua (100–120 rpm). Para *S. aureus* y *S. epidermidis*, la incubación se mantuvo durante 24 horas en aerobiosis, mientras

que para *C. acnes* se prolongó por 48 horas en una atmósfera enriquecida con 10% de CO₂.

Tras el tiempo de incubación, se retiraron 50 µL de cada pocillo correspondiente a las posiciones 1 a 12 de los tres replicados de cada condición; los volúmenes fueron reunidos y homogeneizados por posición, y luego sembrados sobre placas de agar para confirmar la MIC por crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron bajo las mismas condiciones descritas para cada microorganismo. Finalmente, la absorbancia de las placas de microdilución fue leída a 550 nm mediante un lector de microplacas (Tecan infinite F50), y tras la incubación de las placas sembradas, se observaron visualmente y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) para corroborar los resultados obtenidos por espectrofotometría.

10) Determinación de la actividad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante de ambos extractos de lampayo, L3D y L3M, utilizando un método cualitativo y uno cuantitativo.

I. Método cualitativo

Para la determinación de la actividad antioxidante de manera cualitativa de los extractos, se utilizó PEG solo como control negativo, y Gold-Vit C® (vitamina C) como control positivo. Se tomó aproximadamente una punta de espátula de vitamina C y se solubilizó en 1 mL de PEG. Se tomó una alícuota de 10 µL del PEG, la vitamina C y los extractos L3D y L3M, respectivamente, y se sembraron en 4 placas cromatográficas de sílica gel, aproximadamente a 1 centímetro del borde inferior de estas. Posteriormente, se realizó una elución de las placas empleando dos combinaciones de solventes, una de baja polaridad utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo 8:2, y una de alta polaridad utilizando una mezcla de cloroformo-metanol 85:15. Finalizada la elución, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente para evaporar los solventes y luego se rociaron con una solución de DPPH 0,2% disuelto en PEG. Las placas se dejaron expuestas a la luz visible por 30 minutos y se consideró como resultado positivo a las muestras que presentaron manchas de color amarillo sobre un fondo violeta al evaluarse bajo luz visible [60].

II. Método cuantitativo DPPH

Para evaluar la actividad antioxidante de manera cuantitativa, se llevó a cabo la prueba DPPH según lo documentado por el trabajo de Zúñiga-López [61]. Para esto, se prepararon soluciones de 50 mg/mL de ambos extractos, L3D y L3M, y una solución de DPPH de 0,0394 mg/mL ambos disueltos en metanol. A la solución de DPPH también se le agregaron 50 mg/mL de PEG para igualar las condiciones para el blanco.

En tubos eppendorf ámbar se añadieron por triplicado 10 µL de cada muestra y 1440 µL de DPPH y se incubaron por 20 minutos protegidos de la luz. Pasado el tiempo, se sembraron 200 µL de las soluciones en una placa de 96 pocillos y se llevó al equipo espectrofotométrico (misma marca y modelo que flavonoides) para realizar la medición a una longitud de onda

de 517 nm frente al blanco. Posterior a la medición, se calculó el % de inhibición de captación de radicales libres de DPPH mediante la ecuación 5:

$$\%Inhibición\ DPPH = \frac{(Ab - Am)}{Ab} \times 100$$

Donde Ab corresponde al blanco, es decir la absorbancia de la solución de DPPH y Am corresponde a las absorbancias de las muestras de los dos extractos con DPPH, respectivamente.

11) Elaboración de formulación tópica con extracto en PEG de *L. medicinalis*

Debido a que los extractos en PEG de *L. medicinalis*, L3D y L3M, son miscibles en agua, se formuló un gel cosmético empleando como agente gelificante al ácido poliacrílico (carbopol) a una concentración del 0,6%, con el objetivo de obtener un gel no comedogénico, apto para aplicación tópica en pieles con tendencia acnéica. La composición de la formulación incluyó el extracto en PEG, propilenglicol, glicerina y agua purificada con conservantes (parabenos) en porcentajes definidos experimentalmente, en cantidad suficiente para completar 50 g de producto. Los ingredientes seleccionados presentan bajo potencial comedogénico y han sido ampliamente utilizados en cosmética por su capacidad humectante y su buena compatibilidad dérmica.

El proceso de elaboración consistió en humedecer el carbopol dispersándolo en el propilenglicol mediante agitación continua para evitar la formación de grumos. Posteriormente, se incorporó el extracto en PEG, la glicerina y el agua bajo agitación manual suave. Finalmente, se ajustó el pH de la mezcla mediante la adición de trietanolamina hasta alcanzar un valor entre 5,5 y 6, compatible con el pH fisiológico de la piel, y, además, para la formación del gel hasta alcanzar una viscosidad final en el rango de 10.000 a 50.000 mPa·s, adecuada para facilitar la aplicación tópica y prolongar el tiempo de permanencia del producto sobre la piel.

12) Actividad fotoprotectora

Para determinar si es que los extractos de lampayo, L3D y L3M poseen actividad fotoprotectora *in vitro* contra la luz ultravioleta UVA y UVB, se hizo uso de la ecuación de Mansur para estimar el factor de protección solar (FPS) de los extractos y las formulaciones cosméticas respectivamente. Adicionalmente, se realizó una evaluación cualitativa de la capacidad de los extractos y las formulaciones de lampayo de bloquear la luz UV.

I. Estimación del factor de protección solar del extracto en PEG y las formulaciones de *L. medicinalis*

Para la estimación del factor de protección solar (FPS) de los extractos en PEG de *L. medicinalis in vitro*, se usó la misma metodología descrita en el trabajo de Gajardo & col. [45]. Para ello, se diluyeron los extractos hasta una concentración de 25 mg/mL en etanol y se midió la absorbancia entre las longitudes de onda 290-320 nm, en intervalos de 5 nm

en un espectrofotometro (ZUZI Model 4201/50), debido a que son las longitudes en las que la radiación UVB es más intensa. En el caso de los extractos, se hizo uso de un blanco compuesto de PEG 25 mg/mL en etanol. Para la estimación del FPS de los geles cosméticos de L3D y L3M, se hizo una dilución de los geles a 25 mg/mL con una mezcla etanol-agua 30:70, y se utilizó como blanco la mezcla etanol-agua debido a que se midió la fotoprotección del gel por completo. Con los datos obtenidos se aplicó la ecuación de Mansur (ecuación 6):

$$FPS = CF x_{290}^{320} \sum EE(\lambda) x I(\lambda) x Abs(\lambda)$$

Donde CF es el factor de corrección (10), EE es la eficacia eritemática del sol, I es la intensidad de la irradiación solar en cada longitud de onda y Abs es la absorbancia medida de la muestra a cada longitud de onda. Los valores de “EE × I” son valores constantes para cada longitud de onda, los que fueron determinados por Sayre, R.M. & col. [62] y se presentan en la Tabla 4:

Tabla 4. Valores normalizados para el cálculo de FPS in vitro.

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

13) Desarrollo de modelo de piel sintética

Para poder medir cómo se comportan los geles de lampayo sobre la humectación y elasticidad de la superficie cutánea sin tener que hacer pruebas *in vivo*, se precisó de un modelo de piel replicable en laboratorio, el que fuera capaz de imitar las características mecánicas de la piel del ser humano, especialmente del antebrazo, que es una de las zonas del cuerpo donde se prueban cosméticos en el ser humano.

Para ello se tomó como referencia los trabajos de Keshavarzi, F. & col., Lir, I. & col., y Deng, Y. & col. [63, 64, 65], por lo que se utilizó gelatina como polímero que imita la composición de la piel, glicerol como plastificante para entregarle flexibilidad a la gelatina y formaldehído como agente reticulante, para generar estabilidad de las redes poliméricas de gelatina y entregar resistencia mecánica. Se utilizó un diseño de experimentos Box-Behnken (DoE)

para definir el comportamiento de la elasticidad y humedad del modelo de piel al cambiar las concentraciones de las tres variables (gelatina, glicerol y formaldehído) y establecer la mejor combinación que imite la piel de antebrazo y rostro. El diseño experimental consideró las siguientes variables: concentración de gelatina (5, 10 y 15%), concentración de glicerol (20, 40 y 60%) y concentración de formaldehído (0, 0,5 y 1%), y fue aleatorizado con un total de 15 ejecuciones (Tabla 5):

Tabla 5. Combinaciones aleatorias de las concentraciones de gelatina, glicerina y formaldehído, señaladas como concentración baja (-), media (0) y alta (+).

Patrón	Gelatina (%)	Glicerina (%)	Formaldehído (%)
- 0 +	5	40	1
- - 0	5	20	0,5
0 0 0	10	40	0,5
0 - +	10	20	1
0 0 0	10	40	0,5
+ - 0	15	20	0,5
0 + +	10	60	1
0 + -	10	60	0
- 0 -	5	40	0
+ 0 -	15	40	0
0 0 0	10	40	0,5
+ 0 +	15	40	1
+ + 0	15	60	0,5
- + 0	5	60	0,5
0 - -	10	20	0

Para la elaboración de las láminas de piel sintética se disolvió gelatina (Bloom ~300 g, Sigma Aldrich) en agua destilada (55°C) y se ajustó el pH a 9 añadiendo NaOH 1M. Luego, se añadió la cantidad correspondiente de glicerol (MMPP), y una vez se alcanzó una temperatura de 45°C, se agregó el formaldehído (Sigma Aldrich) a la solución de gelatina y se llevó a un baño de ultrasonido a 45°C por 5 minutos para eliminar las burbujas en la solución. Posteriormente, se vertió 4 mL de cada solución de gelatina en placas Petri de

35x10 mm, cuidando que fuera una capa uniforme. Por último, las placas se dejaron reposar cubiertas por 24 horas.

La evaluación de las propiedades mecánicas de las pieles sintéticas se llevó a cabo mediante mediciones de contenido de humedad y elasticidad superficial. Para determinar la hidratación se utilizó un MoistureMeter® SC (Delfin), instrumento basado en la medición de la constante dieléctrica del estrato córneo, lo que permite estimar de forma indirecta el contenido de agua presente en la piel. La elasticidad, por su parte, fue evaluada mediante un ElastiMeter® (Delfin), equipo diseñado para registrar la capacidad de recuperación mecánica de la superficie cutánea tras la aplicación de una presión controlada. Las mediciones se realizaron diariamente durante cinco días consecutivos, con el objetivo de observar la evolución de estos parámetros en el tiempo. Posteriormente, se seleccionó el día cuyos resultados mostraron menor variabilidad, y los datos obtenidos fueron ingresados al software estadístico JMP®. A través de este programa se evaluó si existía correlación entre los valores de humedad y elasticidad, con las diferentes proporciones de gelatina, glicerol y formaldehído. Con base en este análisis, se seleccionó la formulación cuya respuesta fue más cercana a las características de la piel humana, con el fin de utilizarla como modelo sintético para la posterior aplicación y evaluación de formulaciones cosméticas.

14) Evaluación cualitativa de la fotoprotección

Para confirmar la capacidad de *L. medicinalis* para bloquear la radiación ultravioleta, se utilizaron tarjetas de prueba UV. Esto debido a que las tarjetas tienen un compuesto fotocromático que, al ser expuesto a este tipo de radiación, son capaces de absorber energía y cambiar su estructura molecular, alterando la forma en que reflejan la luz visible, por lo que cambian de color. A mayor intensidad de radiación UV, mayor intensidad de color. La configuración experimental se puede observar en la Figura 4:

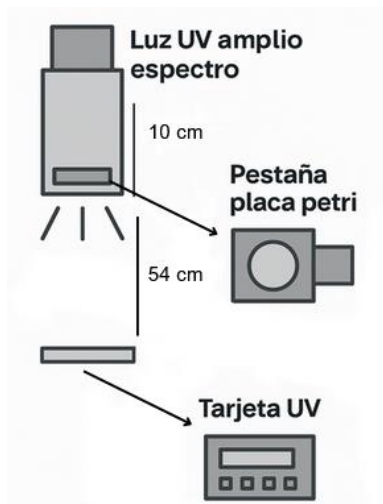


Figura 4. Esquema de la configuración experimental de la evaluación cualitativa de protección UV. Creado con Canva.

Con esta configuración, se evaluó la capacidad de fotoprotección de distintas variables aplicadas sobre piel artificial, bajo condiciones controladas de irradiación. Las condiciones experimentales incluyeron: exposición directa a la luz UV, piel artificial sin tratamiento (control negativo), piel con gel base sin extracto, piel con filtros solares Eusolex® 6300 y Eusolex® 4360 como control positivo, aplicados a una concentración de 15 mg cada uno en 30 mL de glicerina, piel con extracto L3D, piel con extracto L3M, piel con gel formulado con extracto L3D y piel con gel formulado con extracto L3M. A cada muestra se aplicó una dosis de 2 mg/cm² de producto respectivo, la cual fue uniformemente esparcida sobre la superficie con un dedo enguantado durante 30 segundos.

Posteriormente, las muestras se dejaron en reposo por 20 minutos para permitir la formación de la película superficial, tras lo cual cada placa fue colocada individualmente en el compartimento de la cámara. Una tarjeta UV se posicionó directamente bajo la cámara, alineada con la muestra, y se procedió a irradiar durante 10 segundos con la lámpara UV. Inmediatamente después de la exposición, se capturó una imagen de cada condición experimental. Todas las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software ImageJ, utilizando parámetros estandarizados de intensidad y área de cambio de color en las tarjetas UV.

4. Resultados y discusiones

1) Identificación taxonómica

La identificación taxonómica de las hojas de lampayo fue llevada a cabo por la botánica Mg. Pamela Ramírez, curadora del Herbario VALPL de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Playa Ancha. Para ello, se aplicó el método de Schultze [51], mediante el cual se identificó que el material recolectado corresponde a *Lampayo medicinalis* F. Phil, lo cual fue comparado con el comprobante VALPL_PLV:2283, el cual es el voucher herbario que registra la identificación realizada al espécimen certificado. Los resultados se pueden apreciar en la Figura 5:

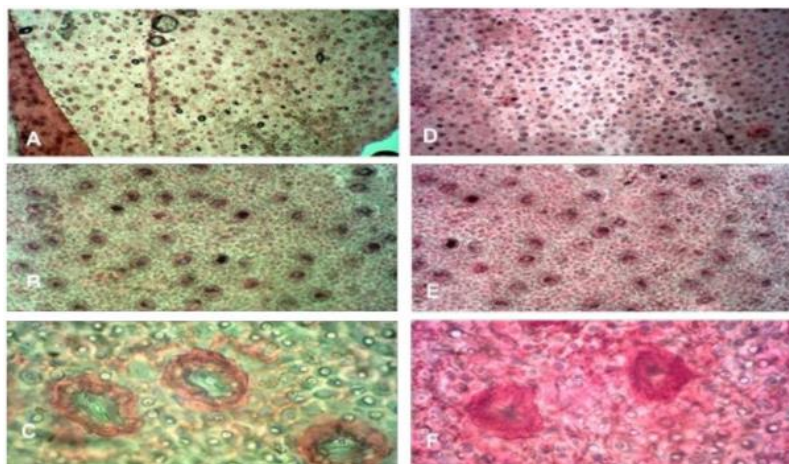


Figura 5. A(4x), B(10X) y C(40X) *Lampayo medicinalis* Phil. (*Lampayo* recolectado). D(4x), E(10X) y F(40X) *Lampayo medicinalis* Phil. (*Lampaya* de referencia Voucher VALPL_PLV:2283)

La morfología de las hojas de lampayo evidencia características anfiestomáticas, con estomas abundantemente distribuidos y dispuestos de manera similar (A y D).

Asimismo, se observó una cutícula de espesor considerable, sin presencia de células anexas alrededor de los estomas. Las células oclusivas mostraron un engrosamiento cuticular a nivel del ostiolo (B-E y C-F), situándose por debajo del plano de las células epidérmicas adyacentes, lo cual reafirma la correcta identificación de la especie. Para el análisis, los tejidos fueron observados y comparados utilizando un microscopio óptico con lentes de aumento de 4x, 10x y 40x. Esto permitió examinar con precisión el tipo de estomas, la morfología de las células epidérmicas y epinervias, así como la presencia y características de distintos tipos de tricomas y glándulas. Estos resultados son concordantes con las investigaciones previas realizadas en LAQUIMEB por Castillo [58], López [55] y Caballero [67].

2) Procesamiento del material y análisis de partículas

Los resultados obtenidos al realizar la caracterización granulométrica del polvo de lampayo, muestran una distribución amplia de tamaños de partícula, con valores característicos

de $x_{10,3} = 14,91 \mu\text{m}$, $x_{50,3} = 42,14 \mu\text{m}$, $x_{90,3} = 252,50 \mu\text{m}$ y $x_{99,3} = 406,44 \mu\text{m}$, lo que indica que el 90% de las partículas tienen un tamaño inferior a $252,50 \mu\text{m}$, y solo un 10% son menores a $14,91 \mu\text{m}$. El diámetro medio superficial (SMD) fue de $28,32 \mu\text{m}$, mientras que el diámetro medio volumétrico (VMD) alcanzó los $88,79 \mu\text{m}$, evidenciando la presencia de partículas de mayor volumen que influyen en el valor promedio. La curva de distribución presentó una simetría del 98,85%, lo que indica un perfil continuo y homogéneo. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla 6:

Tabla 6. Resultados y parámetros característicos de tamaño de partícula del polvo de L. medicinalis.

Parámetro	Significado	Valor (μm)
$x_{10,3}$	10% de las partículas $\leq$ este tamaño (fracción fina)	14,91
$x_{50,3}$	50% $\leq$ este tamaño (mediana)	42,14
$x_{90,3}$	90% $\leq$ este tamaño (fracción gruesa)	252,50
$x_{99,3}$	99% $\leq$ este tamaño (valor extremo superior)	406,44
SMD	Diámetro medio superficial	28,32
VMD	Diámetro medio volumétrico	88,79

Los valores obtenidos indicaron que el polvo de lampayo utilizado presentó una distribución de tamaño polidispersa, esto debido a que hay muchas partículas finas (que aportan superficie) y algunas partículas grandes (que aportan volumen y masa). El valor $x_{50,3} = 42,14 \mu\text{m}$ indica que al menos la mitad de la muestra está compuesta por partículas finas, lo cual es beneficioso en términos de área superficial porque favorece una interacción más eficiente con el solvente al realizar la extracción. Esto se complementa con el $\text{SMD} = 28,32 \mu\text{m}$, que refleja una alta disponibilidad de área de contacto, útil para maximizar la liberación de compuestos solubles durante la maceración. Por otro lado, la presencia de partículas grandes, evidenciada por el valor de $x_{90,3}$ y $x_{99,3}$, puede afectar la eficiencia del proceso de extracción. Sin embargo, el hecho de que el 90% de las partículas sean menores a $252,50 \mu\text{m}$ indica que la fracción es minoritaria y probablemente no compromete en gran medida la eficiencia de extracción.

Si bien la muestra vegetal tamizada con malla de $355 \mu\text{m}$ mostró una distribución de tamaño mayoritariamente inferior al límite del tamiz, con una fracción significativa de partículas finas ($x_{10,3} = 14,91 \mu\text{m}$), la presencia de partículas más grandes sugiere que se podría llevar a cabo un proceso de molienda y tamizado más riguroso para obtener una distribución de tamaño más homogénea. Aun así, la granulometría observada se considera adecuada para fines extractivos, debido a que hay estudios que evidencian que el rendimiento de los extractos vegetales puede aumentar al disminuir el tamaño de partícula [67], pero si este

disminuye demasiado, puede entorpecer el proceso de extracción por aglomeración, por lo que el polvo utilizado fue capaz de ofrecer una buena relación entre superficie disponible y manejabilidad del polvo [68].

3) Preparación del extracto en PEG de *L. medicinalis*

Para preparar el extracto L3D, se utilizaron 20 g de polvo fino y 111,7 g de PEG, y posterior al filtrado se obtuvo un peso de 69,8 g, por lo que al aplicar la “ecuación 1”, arrojó un rendimiento de 62,48% p/p. En el caso del extracto L3M, se utilizaron 10 g de polvo fino y 55,9 g de PEG, obteniendo un peso final de 36,6 g después de filtrar, por lo que su porcentaje de rendimiento correspondió a 65,47% p/p. Estos valores se consideran moderadamente altos y se asemejan al rendimiento de 78,6% p/p obtenido en la metodología que se usó como referencia [49].

Dada la naturaleza no volátil del PEG, cuyo punto de ebullición sobrepasa los 200°C, es que no se pudo estimar el porcentaje de rendimiento de la manera tradicional (masa del extracto seco/masa de la materia prima seca * 100), porque el solvente no se lograría evaporar sin comprometer la integridad de los compuestos extraídos. Sin embargo, los rendimientos obtenidos para los extractos L3D y L3M indican que, en ambos casos, aproximadamente dos tercios del peso del solvente inicial se recuperaron en forma de extracto líquido tras el proceso de extracción y filtrado, lo que resulta especialmente relevante porque el extracto se utilizará directamente en forma líquida. Además, la similitud entre los rendimientos obtenidos para ambos extractos sugiere que la extracción aplicada fue reproducible, a pesar de que se utilizaron masas diferentes de planta y solvente.

Aun así, este método no permite estimar directamente la cantidad real de compuestos extraídos desde el lampayo, debido a que el extracto permanece como solución.

4) Caracterización física del extracto

I. Características organolépticas.

Los extractos obtenidos posterior al proceso de maceración y filtrado, resultaron en un líquido no turbio, de color verde intenso y apariencia homogénea, sin partículas en suspensión. En cuanto al olor, adquirieron el olor característico del lampayo, como el que presenta la especie en su estado natural, pero con menor intensidad y más dulce. Y en cuanto a textura, resultaron con una consistencia ligeramente viscosa, similar a la de un jarabe liviano debido al solvente utilizado. El aspecto de los extractos se puede apreciar en la Figura 6:

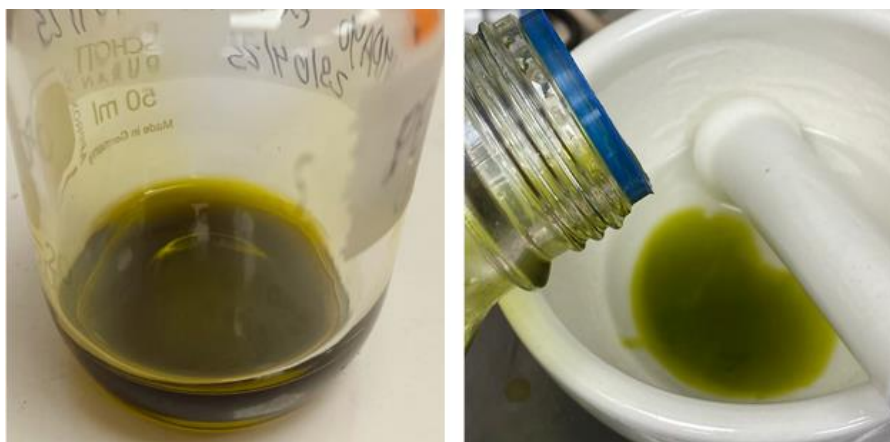


Figura 6. Aspecto de los extractos L3D y L3M posterior al filtrado.

II. Densidad, viscosidad relativa y pH

Los resultados obtenidos al medir la densidad, viscosidad relativa y pH se resumen en la Tabla 7:

Tabla 7. Resultados de los parámetros de densidad, viscosidad y pH.

Parámetro	L3D	L3M
Densidad (g/mL)	1,145	1,146
Viscosidad (mPas)	124	130
pH	5,4	5,3

El PEG por sí solo tiene una densidad de 1,13 g/mL, una viscosidad de 110 mPas y un pH entre 4,5-7,5 (en este caso el valor registrado fue de 5,6), por lo que el cambio de estas propiedades se debe a que los extractos líquidos finales ya no son PEG puro, sino una mezcla del solvente más los compuestos solubilizados desde el material vegetal. Estos compuestos, en su mayoría de alta polaridad, tienen su propia masa molecular y propiedades para formar enlaces, y al disolverse en el PEG son capaces de aumentar la masa total y la viscosidad del solvente, y también de disminuir el pH (sobre todo compuestos fenólicos como los flavonoides [69]). Además, las leves diferencias entre L3D y L3M puede tener directa relación con los tiempos de maceración, el solvente en L3M estuvo de manera más prolongada (3 meses) en contacto con el material vegetal.

5) Tamizaje fitoquímico

Los resultados del análisis fitoquímico se clasificaron utilizando la siguiente escala: ausente (-), presencia leve (+), presencia abundante (++) y presencia muy abundante (+++). Los resultados del análisis indicaron la presencia de alcaloides, saponinas, fitoesteres,

terpenoides, taninos, flavonoides, glucósidos, cumarinas y quinonas, tanto en el extracto L3D como en el L3M, lo que se resume en la Tabla 8:

Tabla 8. Resumen de los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos L3D y L3M.

Metabolito secundario	Ensayo	Resultado	
		L3D	L3M
Alcaloides	Hager	-	-
	Mayer	-	-
	Wagner	+++	+++
	Dragendorff	+++	+++
Saponinas	Espuma	+	+
Terpenos		+	+
Triterpenos	Libermann-Burchardt	+	+
Fitoesteroles		-	-
Triterpenos	Salkowski	+	+
Fitoesteroles		-	-
Terpenoides	Cloroformo y ácido sulfúrico	++	++
Taninos	Cloruro férrico (FeCl ₃) 12,5%	H: - C: +++	H: - C: +++
Flavonoides	Cloruro de aluminio (AlCl ₃) 3%	+++	+++
	Shinoda	+++	+++
Glucósidos	Fehling	++	++
Cumarinas	Fluorescencia	+	+
Quinonas	Quinonas	+++	+++

Alcaloides

Al agregar los diferentes reactivos a los extractos acidificados con HCl, se pudo observar la formación de precipitado en todos los tubos, tanto para L3D como para L3M, como se puede observar en la Figura 7:

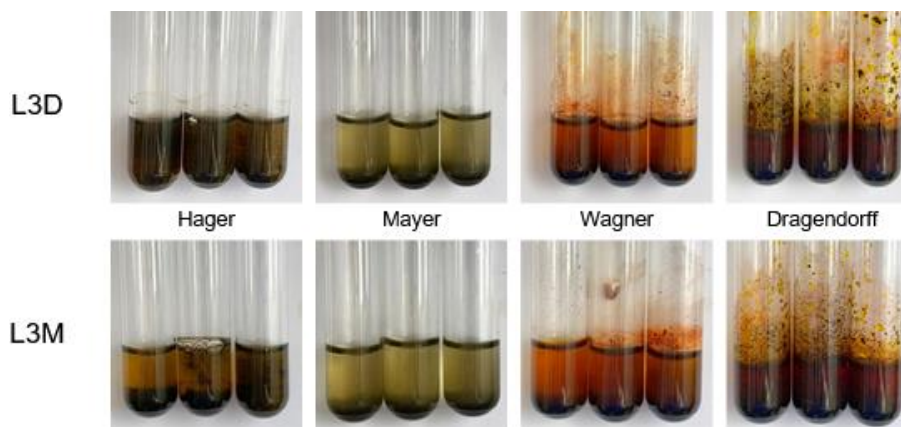


Figura 7. Resultados de los ensayos de Hager, Mayer, Wagner y Dragendorff para alcaloides, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

Si bien para el reactivo de Hager y Mayer hubo formación de precipitado, este no fue del color que indica la literatura (amarillo, crema) [53], por lo que se consideró como un resultado negativo (-). No obstante, los extractos sí dieron positivo para los reactivos de Wagner y Dragendorff, debido a que ocurrió la formación de precipitado de color marrón rojizo y rojo respectivamente, y fue clasificado como una presencia muy abundante (+++) debido a que se puede observar de forma muy evidente el precipitado.

Los alcaloides son compuestos de naturaleza básica que contienen uno o más átomos de nitrógeno, comúnmente incorporados dentro de estructuras cíclicas. Esta configuración estructural les confiere buena solubilidad en solventes polares, especialmente en medios ácidos donde se protonan formando sales hidrosolubles. Estos metabolitos se pueden clasificar en alcaloides heterocíclicos (o típicos), que presentan el nitrógeno como parte de un anillo, y alcaloides no heterocíclicos (o atípicos), en los que el nitrógeno se encuentra fuera del sistema cíclico principal.

A pesar de que muchos alcaloides presentan cierta toxicidad, tales propiedades pueden representar mecanismos de defensa química contra herbívoros o patógenos. De hecho, en las plantas, su biosíntesis se considera una estrategia adaptativa frente a presiones ambientales, incluyendo infecciones microbianas y ataques de depredadores [70]

Además, los alcaloides han sido ampliamente estudiados por sus diversas actividades biológicas. Entre los efectos más destacados se encuentran las propiedades citotóxicas, anestésicas, antibacterianas, antifúngicas, antidiabéticas, antidepresivas y antioxidantes, lo que los convierte en una fuente valiosa para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos [71, 72]

Los resultados obtenidos coinciden con los registrados por Caballero [66] al aplicar los mismos reactivos en un extracto hidroalcohólico de lampayo. En su trabajo se cuantificaron los alcaloides por el método de azul de bromocresol [73] presentando un valor de 0,38 µg/100g de papaverina clorhidrato, lo que sugiere una baja presencia de alcaloides en *L.*

medicinalis. En base a esto, es que los resultados obtenidos de L3D y L3M podrían hasta tratarse de falsos positivos debido a que los reactivos de Dragendorff y Wagner reaccionan de manera inespecífica con compuestos nitrogenados que han sido protonados en medio ácido [52], y también podría explicar el resultado negativo de los reactivos de Hager y Mayer, por la escasa o nula presencia de alcaloides en los extractos.

Saponinas

Al aplicar la prueba de espuma a los extractos L3D y L3M, se obtuvieron los resultados observados en la Figura 8:



Figura 8. Resultados del ensayo de espuma para saponinas, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

La espuma formada en ambos extractos persistió después de los 15 minutos de reposo indicados en el método. En el caso de L3D, la altura de la espuma de los tres tubos fue menor a 5 mm, por lo que teóricamente se clasificaría como un resultado negativo (-) a la presencia de saponinas, sin embargo, la espuma persistió de manera estable hasta el día siguiente, por lo que se clasificó finalmente como un resultado positivo (+). En el caso de L3M, la espuma fue de 5-10 mm en dos de los tubos, y menor que 5 mm en solo uno. A diferencia de L3D, este sí se pudo clasificar directamente como un resultado positivo (+) a la presencia de saponinas por la cantidad de espuma, y por su estabilidad, que también perduró hasta el día siguiente.

Las saponinas son metabolitos estructuralmente complejos, tienen una porción glucídica (glucón) y una no glucídica (aglicón), y se encuentran distribuidas de manera ubicua en el reino vegetal. Estos compuestos poseen una naturaleza anfipática, ya que combinan un esqueleto hidrofóbico (el aglicón) con una región hidrofílica (los azúcares). Esta propiedad les otorga características espumantes y emulsionantes, por eso la naturaleza del ensayo de espuma. Según el tipo de esqueleto carbonado del aglicón, las saponinas se clasifican en esteroidales, alcaloides esteroidales y triterpenoides y han demostrado una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo propiedades antimicrobianas, antifúngicas, insecticidas, pesticidas, molusquicidas, hipocolesterolémicas, anticarcinogénicas, antiinflamatorias y antivirales [74]

La presencia de estos compuestos en los extractos concuerda con la literatura, lo que se ha registrado en las investigaciones de Garrido & col. [75] por cromatografía en capa fina

(TLC), además de los ensayos de espuma realizados por López [55] y Caballero [66] de un extracto hidroalcohólico.

Terpenos, triterpenos, fitoesteroles y terpenoides

Al llevar a cabo el ensayo de Libermann-Burchardt y Salkowski en los extractos L3D y L3M, se obtuvieron los resultados observados en la Figura 9:

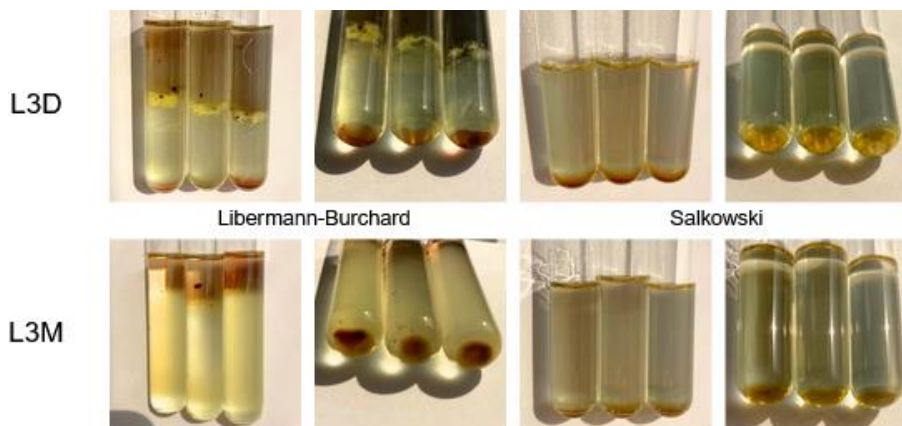


Figura 9. Resultados del ensayo de Libermann-Burchard y Salkowski para terpenos, triterpenos y fitoesteroles, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

En el caso del ensayo de LB, se consideró como un resultado positivo (+) a la presencia de terpenos y triterpenos por la formación de coloración rojiza en los tubos de ensayo, y negativo (-) para fitoesteroles porque no hubo formación de coloración verde. La suspensión de color verde que se observa en el ensayo fue debido a que el PEG de los extractos no fue completamente miscible en cloroformo.

En el caso del ensayo de Salkowski, se consideró como un resultado positivo (+) a la presencia de triterpenos debido a la formación de coloración amarilla en la solución y el fondo de los tubos de ensayo, y negativo para fitoesteroles porque no existió formación de coloración roja.

Para el ensayo de terpenoides, al agregar el ácido sulfúrico a los extractos disueltos en cloroformo, se obtuvieron los resultados observados en la Figura 10:

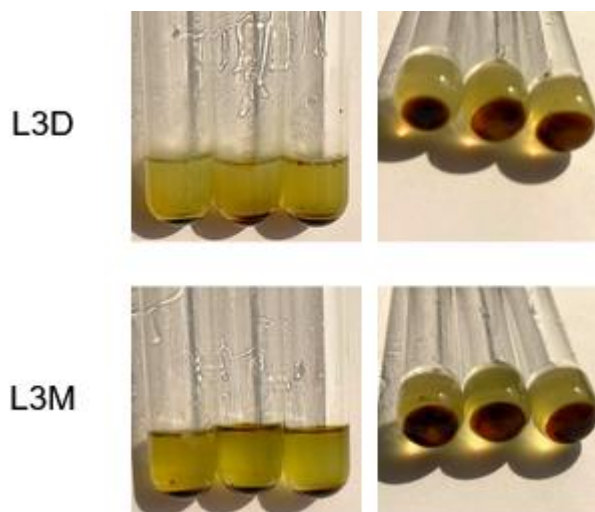


Figura 10. Resultados del ensayo de cloroformo y ácido sulfúrico para terpenoides, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

Se consideró la prueba como positiva (++) a la presencia de terpenoides debido a que existió la formación de coloración café de manera abundante para ambos extractos en el fondo de los tubos de ensayo.

Los terpenos, también conocidos como isoprenoides, constituyen un grupo amplio y diverso de metabolitos secundarios. Aunque terpenos y terpenoides suelen utilizarse indistintamente, presentan diferencias químicas: los terpenos son compuestos volátiles e insaturados formados por unidades monoméricas de isopreno (C_5), mientras que los terpenoides corresponden a una clase modificada de terpenos que contienen grupos funcionales adicionales en distintas posiciones de la molécula. La clasificación de los terpenos se basa principalmente en el número de unidades de isopreno, por lo que así se distinguen monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), entre otros. Dentro del grupo de los terpenoides se incluyen compuestos como iridoides, sesquiterpenoides, lactonas sesquiterpénicas, diterpenoides, saponinas triterpenoides, saponinas esteroidales, cardenólidos, bufadienólidos, fitoesteroles, cucurbitacinas, nortriterpenoides, carotenoides, y otros derivados triterpénicos [76].

Los terpenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en las plantas, donde conforman componentes característicos de los aceites esenciales. Estas moléculas son responsables de características sensoriales como el aroma, sabor y color de las plantas. Entre las propiedades farmacológicas atribuidas a estos compuestos se destacan sus efectos antiinflamatorios, antibacterianos, antitumorales y antivirales, así como su potencial en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares [77].

Los fitoesteroles son terpenoides esteroideos cuya estructura es análoga a la del colesterol. Estos compuestos se localizan principalmente en las membranas celulares de las plantas, donde cumplen funciones estructurales similares a las del colesterol en células animales,

modulando la fluidez y permeabilidad de las membranas. Han demostrado poseer otras actividades biológicas, como propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, inmunomoduladoras, antitumorales y antimicrobianas [78].

Dado que el PEG es un solvente polar, no se esperaría la extracción de compuestos con baja polaridad, como los terpenos y fitoesteres, los cuales suelen mostrar mayor afinidad por solventes más apolares. Sin embargo, en el estudio realizado por Garrido & col. [75], se confirmó la presencia de terpenos en extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de *L. medicinalis*, lo que sugiere que algunos terpenos, particularmente aquellos con grupos funcionales ligeramente más polares, podrían encontrarse presentes incluso en extractos polares como los de L3D y L3M. En contraste, la ausencia de fitoesteres en estos extractos es completamente esperable, considerando su estructura altamente lipofílica y su escasa solubilidad en medios polares como el PEG. De hecho, este tipo de metabolitos ha sido identificado exclusivamente en extractos preparados con solventes menos polares, tales como hexano o acetato de etilo [55].

Taninos

Al agregar el cloruro férrico al 12,5% a las alícuotas de L3D y L3M, se obtuvieron los resultados observados en la Figura 11:

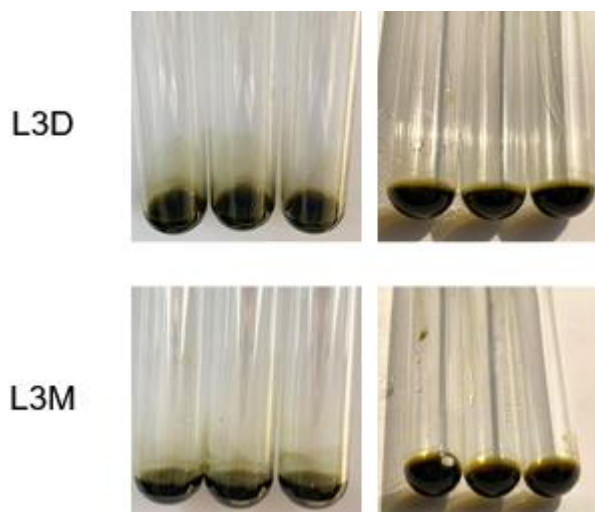


Figura 11. Resultados del ensayo de cloruro férrico al 12,5% para taninos, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

La prueba se consideró como positiva (+++) para taninos condensados debido a la formación de una coloración verde muy intensa y evidente, pero negativa (-) para taninos hidrolizables porque no se observó la formación de coloración azul completa.

Por definición, el término “tanino” se aplica comúnmente a cualquier compuesto polifenólico de alto peso molecular que posea un número suficiente de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales capaces de formar enlaces con distintas macromoléculas. Estos metabolitos

son hidrosolubles y tienen la capacidad de formar complejos con proteínas, ácidos nucleicos, alcaloides, minerales y polisacáridos. Una de las características más distintivas es su astringencia, y se encuentran distribuidos ampliamente en casi todas las partes de las plantas.

Desde el punto de vista estructural, los taninos se dividen en dos grandes clases: los taninos hidrolizables y los taninos condensados [79]. Los hidrolizables están formados por un alcohol poli hidroxilado, generalmente glucosa, cuyos grupos —OH se encuentran esterificados con ácidos fenólicos, como el ácido gálico o eláxico. Este tipo de taninos puede ser hidrolizado fácilmente en condiciones ácidas, básicas o enzimáticas. En contraste, los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas, son polímeros de unidades de flavan-3-ol (como catequina o epicatequina), unidas entre sí por enlaces carbono-carbono. Esta conformación estructural los hace resistentes a la hidrólisis, incluso bajo condiciones extremas.

Estos compuestos son reconocidos por sus propiedades antiinflamatorias, cardioprotectoras y antioxidantes, y su consumo se ha asociado con una reducción del riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer [80].

La presencia de estos metabolitos en los extractos L3D y L3M coincide con lo registrado en el trabajo de Morales & col. [42] en el tamizaje fitoquímico de un extracto etanólico de alta polaridad. El resultado obtenido también coincide con los de López y Caballero [55, 66], con la diferencia de que en los extractos en PEG no se detectaron taninos hidrolizables.

Flavonoides

Al llevar a cabo el ensayo con cloruro de aluminio al 3% y el de Shinoda, se obtuvieron los resultados observados en la Figura 12:

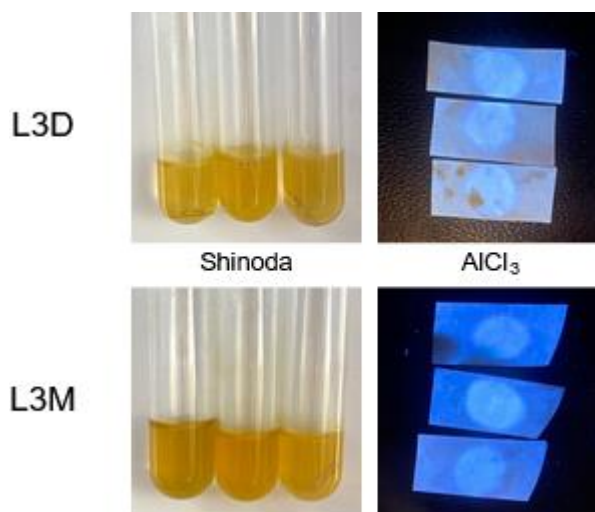


Figura 12. Resultados del ensayo de cloruro de aluminio 3% y Shinoda para flavonoides, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

En el caso del AlCl_3 al 3%, se consideró la prueba como positiva (++) a la presencia de flavonoides, puesto que al exponer los papeles filtro a luz UV a 365 nm, se pudo observar fluorescencia de color verde de manera evidente tanto para L3D como para L3M. Por otro lado, también se consideró la prueba de Shinoda como positiva (++) debido a que apareció una coloración naranja evidente en todos los tubos de ensayos.

Los flavonoides son un grupo amplio y diverso de metabolitos secundarios polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Su estructura básica está compuesta por 15 átomos de carbono dispuestos en un esqueleto C6-C3-C6, es decir, dos anillos bencénicos (A y B) conectados por una cadena de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico (C). Se clasifican en función de su grado de oxidación y patrón de sustitución del anillo central en: flavonas, flavonoles, antocianinas e isoflavonas [81]. Estos compuestos han evidenciado una variedad de actividades biológicas como antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, anticancerígenos, cardioprotectores y vasodilatadores [82].

En el contexto de los extractos L3D y L3M, la presencia de flavonoides resulta sumamente relevante puesto que tienen la capacidad de actuar como filtros naturales frente a la radiación UV, especialmente en las plantas, donde protegen a los tejidos de los daños inducidos por la luz solar. Como estos compuestos poseen una estructura conjugada, les permite absorber eficientemente radiación UV-B (280–320 nm) y UV-A (320–400 nm) y disipar la energía absorbida de manera no dañina en forma de calor o fluorescencia (como se puede observar en la Figura X) evitando la formación de radicales libres en los tejidos, además de ser capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) si es que se llegan a producir efecto de la radiación UV [83].

La presencia de estos compuestos en los extractos L3D y L3M resulta esperable, dado que se trata de metabolitos con naturaleza polar, lo que favorece su solubilidad y extracción en un solvente polar como lo es el PEG. Además, diversos trabajos han reportado la presencia de flavonoides en extractos polares obtenidos a partir de *L. medicinalis*, lo que respalda su detección en las muestras analizadas [23, 39, 41, 42].

Glucósidos

Una vez terminado el tiempo de reposo después de agregar los reactivos de Fehling A y Fehling B e incubar por 3 minutos a 80°C, se obtuvieron los resultados observados en la Figura 13:



Figura 13. Resultados del ensayo de Fehling para glucósidos, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

La prueba se consideró como positiva (+) a la presencia de glucósidos puesto que pasado el tiempo de reposo se pudo observar la formación de una coloración roja dentro de los tubos de ensayo para ambos extractos.

El ensayo de Fehling se basa en la detección de azúcares reductores, los cuales poseen grupos hidroxilo libres en su estructura que les permiten formar puentes de hidrógeno, facilitando su solubilidad en solventes polares como el PEG. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran diversos glucósidos, cuya variedad estructural ha sido ampliamente descrita. Así, Morales y Paredes [23] identificaron el piceol, una aglicona derivada del glucósido iridoide genipósido, a la cual se le ha atribuido actividad antimetastásica. Por otro lado, también se identificó la molécula de genipina, la que se destaca por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, antiplaquetarias y antimicrobianas.

Al ser compuestos polares, se podría esperar la presencia de estos en los extractos L3D y L3M en base a la naturaleza polar del solvente utilizado.

Cumarinas

Al realizar el ensayo de fluorescencia, una vez estuvieron fríos los papeles filtro, se observaron bajo luz UV a 365 nm, obteniendo los resultados de la Figura 14:

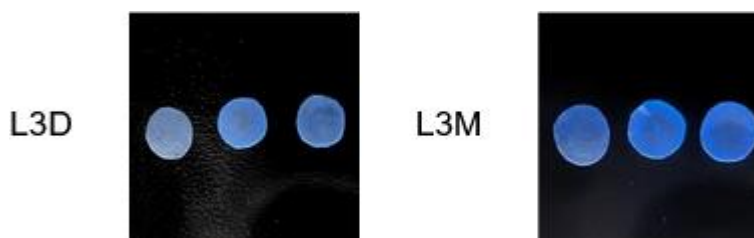


Figura 14. Resultados del ensayo de fluorescencia para cumarinas, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

El ensayo se consideró como positivo (+) a la presencia de cumarinas debido a que los papeles filtro de ambos extractos evidenciaron una leve fluorescencia azul-celeste bajo luz UV, aunque L3D demostró una fluorescencia más intensa que L3M.

Las cumarinas son una familia de metabolitos secundarios derivados del grupo de las benzopironas, porque su estructura básica consiste en un anillo bencénico fusionado con una lactona α -pirona. Estas son moléculas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. La polaridad de estos metabolitos depende de sus sustituyentes, pero la cumarina base (sin sustituciones) es relativamente apolar por tener una estructura aromática y una lactona cíclica con poca capacidad para formar enlaces de hidrógeno con el agua y tampoco posee grupos altamente polares ionizables como carboxilos o aminas. No obstante, algunas cumarinas sustituidas, especialmente aquellas con grupos hidroxilo o glicósidos, pueden presentar una mayor solubilidad en solventes polares.

Las cumarinas tienen relevancia debido a que presentan actividad anticoagulante, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antiviral, entre otros [84, 85, 86]. Además, son conocidas por su capacidad de absorber radiación ultravioleta, particularmente en la región UV-B y UV-A, debido a su sistema conjugado aromático que permite transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$.

La presencia de estos compuestos en los extractos L3D y L3M, aunque leve, resulta interesante dado que no ha sido reportada previamente en los estudios fitoquímicos publicados sobre *L. medicinalis*. En investigaciones anteriores, como las de Ormazabal & col. [40] y Morales & Paredes [23], no se mencionó la detección de este tipo de metabolitos en extractos obtenidos con solventes tanto polares como apolares. Sin embargo, en el presente trabajo se observó una señal positiva tenue en el ensayo de fluorescencia. Esto podría explicarse por la naturaleza del solvente utilizado, PEG400, el cual es polar y puede solubilizar compuestos moderadamente apolares, siempre que contengan grupos funcionales polares (como hidroxilos o glicósidos).

Quinonas

Al llevar a cabo la prueba para detectar la presencia de quinonas, se obtuvieron los resultados que se muestran en la siguiente Figura 15:

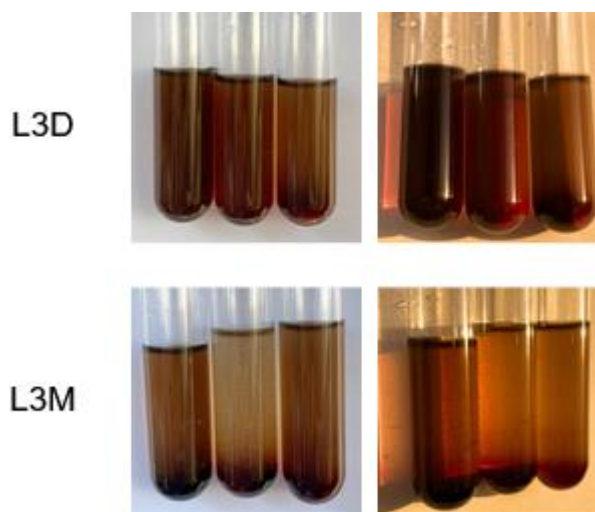


Figura 15. Resultados del ensayo de quinonas para quinonas, en los extractos L3D y L3M en triplicado.

En base a los resultados, se consideró la prueba como positiva (+++) a la presencia de quinonas en ambos extractos debido a la formación evidente y abundante de coloración roja en todos los tubos de ensayos empleados en la prueba.

Las quinonas constituyen una clase de compuestos caracterizados por la presencia de dos grupos carbonilo conjugados dentro de un anillo aromático de benceno. Se originan a partir de la oxidación de compuestos fenólicos presentes en las plantas y, según el número de anillos y la disposición del sistema conjugado, se clasifican en benzoquinonas (un solo anillo), naftoquinonas (dos anillos fusionados) y antraquinonas (tres anillos fusionados). La relevancia de estos metabolitos radica en sus grupos cetónicos, cuyos átomos de oxígeno favorecen la formación de enlaces de hidrógeno y otras interacciones con moléculas polares, facilitando su extracción en solventes de alta polaridad [87].

La detección de quinonas en los extractos L3D y L3M es coherente con su presencia documentada en diversas especies de la familia Verbenaceae, particularmente en forma de naftoquinonas [88]. La presencia de estos compuestos en los extractos de *L. medicinalis* resulta especialmente relevante si se considera el uso tradicional de esta planta como agente antimicrobiano. En este sentido, diversas especies pertenecientes a la familia Verbenaceae han demostrado una potente actividad antimicrobiana *in vitro*, lo que sugiere que la bioactividad atribuida a esta especie podría estar relacionada, al menos en parte, con la presencia de compuestos tipo quinona [89].

Como se ha observado, los extractos preparados en PEG presentaron una composición variada de metabolitos secundarios, los cuales poseen diversas actividades biológicas. Esta variedad fitoquímica puede atribuirse, en gran medida, a las propiedades fisicoquímicas del solvente utilizado. El PEG de bajo peso molecular, como PEG 300, se caracteriza por tener una polaridad elevada ($\pi^* = 0,94$), una capacidad aceptora de enlaces de hidrógeno similar a la del metanol ($\beta = 0,60$ frente a $\beta = 0,62$), y una capacidad donadora de enlaces de hidrógeno menor ($\alpha = 0,45$ frente a $\alpha = 0,93$) [90]. Dado que la diferencia de polaridad entre PEG 300 y PEG 400 es mínima, estas propiedades pueden extrapolarse al solvente utilizado en este trabajo.

Los parámetros π^* , β y α pertenecen a la escala solvatoquímica de Kamlet-Taft, la cual permite describir cuantitativamente cómo un solvente puede interactuar con diferentes solutos. Un valor alto de π^* indica una elevada polaridad, mientras que un valor medio-alto de β refleja una buena capacidad para actuar como base de enlace por puente de hidrógeno. Por otro lado, un valor moderado de α sugiere una acidez débil o capacidad limitada para donar enlaces de hidrógeno [91, 92, 93].

Estas características fisicoquímicas hacen de PEG 400 un solvente versátil, capaz de disolver tanto compuestos altamente polares como aquellos de polaridad intermedia, lo que explica la diversidad de compuestos extraídos. En particular, su capacidad para formar

interacciones con grupos funcionales como hidroxilos ($-\text{OH}$), aminas ($-\text{NH}_2$) y ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$). Además, de permitir una extracción eficaz de flavonoides, taninos, alcaloides y otros metabolitos identificados mediante el tamizaje fitoquímico.

6) Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT) mediante el método de Folin-Ciocalteu

Se construyó la curva de calibrado (Figura 15) con las absorbancias de las concentraciones de ácido gálico entre 20 y 70 $\mu\text{L/mL}$ para determinar el CPT de los extractos L3D y L3M. La curva de calibrado se sometió a pruebas de regresión lineal obteniendo un R^2 de 0,991.

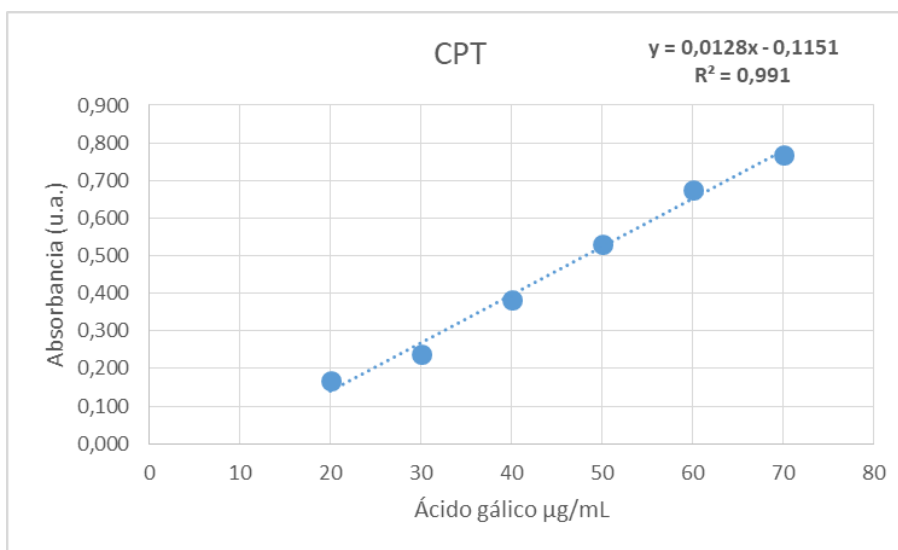


Figura 16. Curva de calibrado para la determinación de CPT usando soluciones patrón de ácido gálico $\mu\text{g/mL}$.

Las absorbancias obtenidas de los extractos L3D y L3M fueron interpoladas en la curva de calibrado. A partir de aquellos datos, se determinó que el CPT para L3D fue de $96,1 \pm 4,5$ mg EAG/mL, y para L3M fue de $91,0 \pm 4,5$ mg EAG/mL.

En estudios previos se han reportado distintas concentraciones de polifenoles totales (CPT) en extractos obtenidos mediante diferentes métodos y solventes. Por ejemplo, Garrido & col. [75] reportaron valores de $9,36 \pm 3,55$ mg EAG/g para una decocción, $58,08 \pm 3,40$ mg EAG/g para maceración en metanol, $18,85 \pm 0,62$ mg EAG/g para maceración en agua, y $37,28 \pm 2,87$ mg EAG/g para infusión, expresado en g de extracto seco. Por otro lado, Morales y Paredes [23] informaron una CPT de $49,18 \pm 0,86$ mg EAG/g en un extracto hidroetanólico seco. Asimismo, los trabajos de Castillo y Caballero [58, 66] indicaron un valor de $19,6 \pm 1,9$ mg EAG/g y $14,0 \pm 0,4$ mg EAG/g de extracto hidroetanólico seco.

Si bien no es posible establecer una comparación directa con los resultados reportados en estudios previos, debido a que en este trabajo la concentración de compuestos en los extractos se expresó en unidades de mg/mL (en lugar de mg/g de extracto seco), esta diferencia se debe a que el extracto se encuentra disuelto en un solvente líquido que no

puede ser evaporado para obtener un residuo seco. No obstante, el valor obtenido puede considerarse elevado en relación con el volumen de muestra empleado. Cabe señalar que este valor relativamente alto podría estar influenciado por la naturaleza polar del solvente utilizado, lo que favorecería la solubilización de compuestos fenólicos, dada su alta polaridad y afinidad por medios polares.

7) Determinación del contenido de flavonoides totales (CFT) mediante el método de AlCl_3

Se construyó la curva de calibrado (Figura 16) con las absorbancias de las concentraciones de quercetina entre 20 y 180 $\mu\text{g/mL}$ para determinar el CFT de los extractos L3D y L3M. La curva de calibrado se sometió a pruebas de regresión lineal obteniendo un R^2 de 0,9989

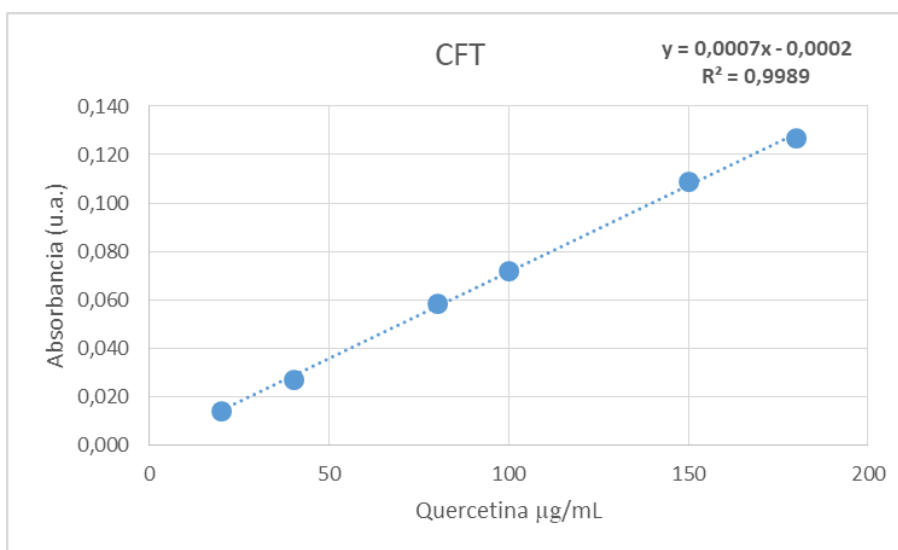


Figura 17. Curva de calibrado para la determinación de CFT usando soluciones patrón de quercetina $\mu\text{g/mL}$.

Las absorbancias obtenidas de los extractos L3D y L3M fueron interpoladas en la curva de calibrado. A partir de aquellos datos, se determinó que el CFT para L3D fue de $24,1 \pm 3,6$ mg EQ/mL, y para L3M fue de $21,2 \pm 2,4$ mg EQ/mL.

En estudios previos se han reportado distintas concentraciones de flavonoides totales (CFT) en extractos obtenidos mediante diferentes métodos y solventes. Por ejemplo, Garrido & col. [75] reportaron valores de $1,36 \pm 0,06$ mg EQ/g para una decocción, $1,16 \pm 0,11$ mg EQ/g para maceración en metanol, $0,51 \pm 0,02$ mg EQ/g para maceración en agua, y $0,73 \pm 0,02$ mg EQ/g para infusión, expresado en g de extracto seco. Por otro lado, Morales y Paredes [23] informaron una CFT de $0,06 \pm 0,01$ mg EQ/g en un extracto hidroetanólico seco. Asimismo, los trabajos de Castillo y Caballero [58, 66] indicaron un valor de $16,5 \pm 0,3$ mg EQ/g y $10,3 \pm 0,4$ mg EQ/g de extracto hidroetanólico seco.

Al igual que con la CPT, no es posible realizar una comparación directa con los extractos L3D y L3M debido a que estos se encuentran en estado líquido y no pueden ser secados,

pero aun así los valores obtenidos en este trabajo son considerablemente superiores a lo registrado en trabajos previos.

Esto podría sugerir que el uso de PEG como solvente permitió una extracción más eficiente de flavonoides, lo que podría estar relacionado con su elevada polaridad y capacidad de formar enlaces por puentes de hidrógeno.

8) Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto de *L. medicinalis*

I. Tinción Gram

Al observar bajo microscopio los portaobjetos con las bacterias fijadas y teñidas, tanto de los medios sólidos como líquidos, se observó lo indicado en la Figura 18:

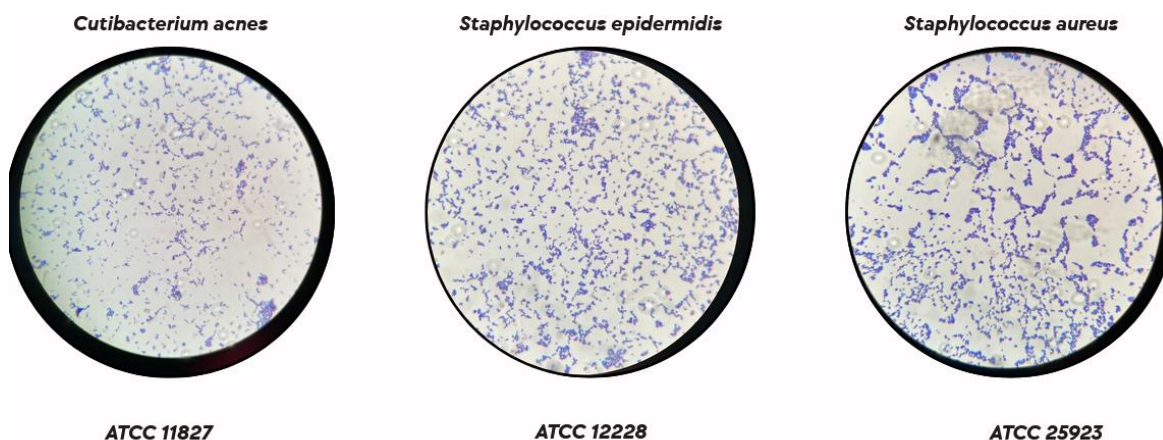


Figura 17. Tinciones Gram realizadas a las bacterias *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, observadas bajo microscopio óptico con objetivo x100.

Como se puede observar en las imágenes, se confirmó la naturaleza Gram positiva de las tres bacterias empleadas, además de su morfología y agrupación bacteriana característica.

En el caso de *C. acnes*, se identificó su forma de bacilos grampositivos cortos, pleomórficos, delgados, no ramificados y no formadores de esporas, los que se agrupan formando estructuras que asemejan a arañas [94]. En el caso de *S. aureus* y *S. epidermidis*, se identificó su forma de cocos grampositivos, los que se agrupan en racimos, pares y, ocasionalmente, en cadenas cortas [95]. Para todos los cultivos realizados de las tres bacterias empleadas no se observó en ningún momento la contaminación con otros microorganismos al momento de la tinción Gram.

II. Ensayo de difusión en agar

Una vez terminado el tiempo de incubación de las diferentes bacterias empleadas en el ensayo, se midieron los halos de inhibición con ayuda de un pie de metro. Con los datos obtenidos, se aplicó la ecuación de actividad relativa (%) para comparar la potencia de los extractos con respecto a los antibióticos de referencia. Los resultados se resumen en la Tabla 9:

Tabla 9. Resultados de los halos de inhibición para Cutibacterium acnes, Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis al aplicar discos de eritromicina, tetraciclina y los extractos L3D y L3M.

Compuesto	Bacteria	Halo (mm)	Control: E (mm)	% Relativo (E)	Control: T (mm)	% Relativo (T)
L3D	<i>C. acnes</i>	1,15	60,00	1,92 %	60,00	1,92 %
	<i>S. aureus</i>	1,50	31,34	4,79 %	25,05	5,99 %
	<i>S. epidermidis</i>	0,41	15,57	2,63 %	17,68	2,32 %
L3M	<i>C. acnes</i>	8,61	60,00	14,35 %	60,00	14,35 %
	<i>S. aureus</i>	1,12	31,34	3,57 %	25,05	4,47 %
	<i>S. epidermidis</i>	0,78	15,57	5,01 %	17,68	4,41 %

Según los criterios establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), se considera a *S. aureus* y *S. epidermidis* bacterias no resistentes cuando el halo de inhibición con tetraciclina y eritromicina es de un diámetro superior a 19 y 23 mm, respectivamente para cada antibiótico. Según esos valores, *S. aureus* no es una bacteria resistente, pero sí lo es *S. epidermidis*, lo que se refleja en la escasa actividad de los extractos ante esa bacteria.

En el caso de *C. acnes* no hay criterios de sensibilidad establecidos, pero es evidente que no es una bacteria resistente al haber inhibido por completo el crecimiento de ambos antibióticos.

Habiendo establecido las características de sensibilidad de las cepas empleadas, al calcular la actividad relativa de los compuestos L3D y L3M en relación con los controles positivos eritromicina (15 µg) y tetraciclina (30 µg), se observó que L3M presentó un 14,35 % de la actividad antimicrobiana de ambos antibióticos frente a *C. acnes*. En contraste, L3D mostró apenas un 1,92 % de eficacia relativa. Frente a *S. aureus*, L3M presentó una actividad relativa del 3,57 % en comparación con eritromicina y del 4,47 % frente a tetraciclina. En el caso de *S. epidermidis*, la actividad relativa fue de 5,01 % (eritromicina) y 4,41 % (tetraciclina).

Estos resultados indican que, aunque las formulaciones no alcanzan la potencia de antibióticos clínicos estándar, L3M exhibe una actividad leve pero específica contra *C. acnes*, y L3D es consistentemente más débil que L3M, mientras que su eficacia frente a cocos Gram positivos fue limitada, posiblemente debido a la escasa difusión de los extractos en el medio sólido por su viscosidad o a una baja afinidad de L3D y L3M hacia estos microorganismos.

III. Ensayo para determinar Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (24 horas para *S. aureus* y *S. epidermidis*, 48 horas para *C. acnes*), las microplacas fueron leídas por espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm, obteniéndose los resultados que se presentan en la Figura 19:



Figura 19. Porcentaje de inhibición (%) observado para Cutibacterium acnes, Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis a concentraciones decrecientes de los extractos L3D, L3M y tetraciclina. CC corresponde al control de crecimiento (solo medio, con bacterias) y CE corresponde al control de esterilidad (solo medio, sin bacterias). Para cada condición experimental se utilizó un único inóculo bacteriano (n=1), sembrado en tres pocillos de la misma microplaca (3 pseudoréplicas técnicas) con el objetivo de reducir el error técnico de la medición.

Al interpretar estos datos, se observó que ni los extractos L3D y L3M, ni el antibiótico de referencia lograron inhibir el crecimiento de las tres bacterias evaluadas en más de un 95 % en función de la absorbancia. Sin embargo, la fiabilidad de estas mediciones se vio comprometida por la interferencia del color de los extractos y de la propia tetraciclina a dicha longitud de onda. Esta interferencia se evidenció particularmente en algunos pocillos, como los de la posición 1 (50 mg/mL L3D y L3M; 20 mg/mL tetraciclina), los cuales se encontraban visualmente transparentes (sin turbidez asociada al crecimiento bacteriano), pero presentaron absorbancias elevadas debido a la formación de precipitados o residuos secos por evaporación del solvente, generando lecturas artificialmente altas.

Dado que esta interferencia limitó la interpretación cuantitativa basada exclusivamente en la absorbancia, se optó por realizar una confirmación microbiológica mediante resiembra. Para ello, se tomó 1 µL de los pseudotriplicados previamente homogeneizados y se sembró en placas con agar para evaluar el crecimiento bacteriano.

Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de unidades formadoras de colonias (UFC) se presentan en la Tabla 10 y Figura 20:

Tabla 10. Resultados de la confirmación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por resiembra para C. acnes, S. aureus y S. epidermidis.

Bacteria	L3D	L3M	Tetraciclina
<i>C. acnes</i>	25 mg/mL	25 mg/mL	0,04 mg/mL
<i>S. aureus</i>	> 50 mg/mL	> 50 mg/mL	5 mg/mL
<i>S. epidermidis</i>	> 50 mg/mL	> 50 mg/mL	20 mg/mL

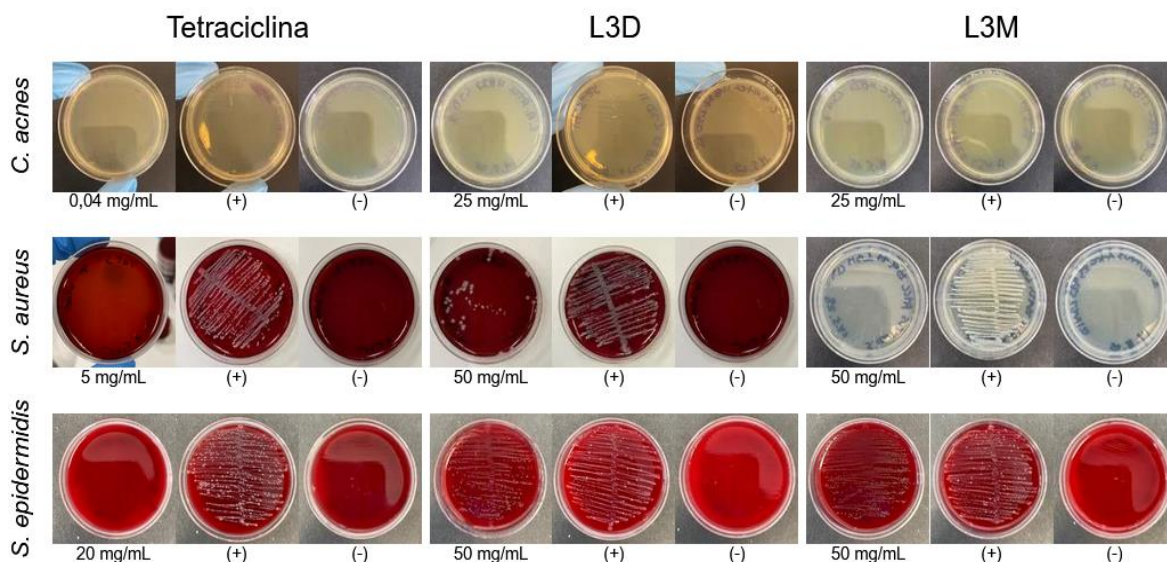


Figura 20. Placas de agar con la MIC para *C. acnes*, *S. aureus* y *S. epidermidis*, comparadas con las placas de los controles de crecimiento positivo (+) y negativo (-)

Si bien no es posible establecer una comparación directa entre la potencia del antibiótico de referencia y la de los extractos a causa de la gran diferencia del valor de la MIC, se observó que tanto L3D como L3M fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento de *C. acnes* a una concentración de 25 mg/mL. En cambio, frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, ambos extractos lograron controlar parcialmente el crecimiento bacteriano a una concentración de 50 mg/mL, en comparación con el control positivo (sin antibiótico). Estos resultados sugieren una actividad antimicrobiana selectiva de los extractos, especialmente dirigida contra *C. acnes*.

La mayor actividad observada de los extractos L3D y L3M frente a *C. acnes* podría estar relacionada con abundante presencia de metabolitos secundarios de tipo fenólico, tales como flavonoides, taninos y cumarinas, conocidos por su capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria. Los flavonoides, en particular, actúan alterando la integridad de la membrana celular bacteriana, inhibiendo enzimas asociadas a la virulencia. Por su parte, los taninos poseen un alto número de grupos hidroxilo que les permite quelar proteínas [96], alterar el equilibrio osmótico de la membrana y ejercer un efecto bacteriostático y antibiofilm, con MIC reportada de 125 $\mu\text{g/mL}$ frente a *C. acnes* [7]. Las cumarinas, aunque menos estudiadas, también han demostrado actividad antimicrobiana directa. La acción conjunta de estos compuestos se ve potenciada por el hecho de que *C. acnes*, como bacteria anaerobia aerotolerante, presenta sistemas antioxidantes limitados, lo que la hace más susceptible al estrés oxidativo inducido por estos metabolitos al alterar su membrana celular [97]. En contraste, bacterias aerobias como *S. aureus* y *S. epidermidis* poseen mecanismos más eficaces para neutralizar este tipo de daño, lo cual podría explicar la menor actividad observada de los extractos L3D y L3M frente a estas cepas [98, 99]. Esta selectividad

sugiere que los extractos evaluados podrían representar una alternativa natural prometedora para el control específico de *C. acnes* en productos tópicos.

9) Determinación de la actividad antioxidante

I. Método cualitativo

Los resultados de la acción AOX cualitativa de los extractos L3D y L3M de *L. medicinalis*, indicaron que ambos tienen actividad AOX, dado que se logró apreciar la decoloración del color violeta del DPPH a un color amarillo, tanto del control positivo (vitamina C) como de ambas muestras. Se observó esta actividad en las placas eluidas con solventes de alta polaridad y baja polaridad, aunque la intensidad del color amarillo es menor a la que exhibió el control positivo (Figura 20). Con estos resultados se decidió llevar a cabo la cuantificación de dicha actividad AOX.

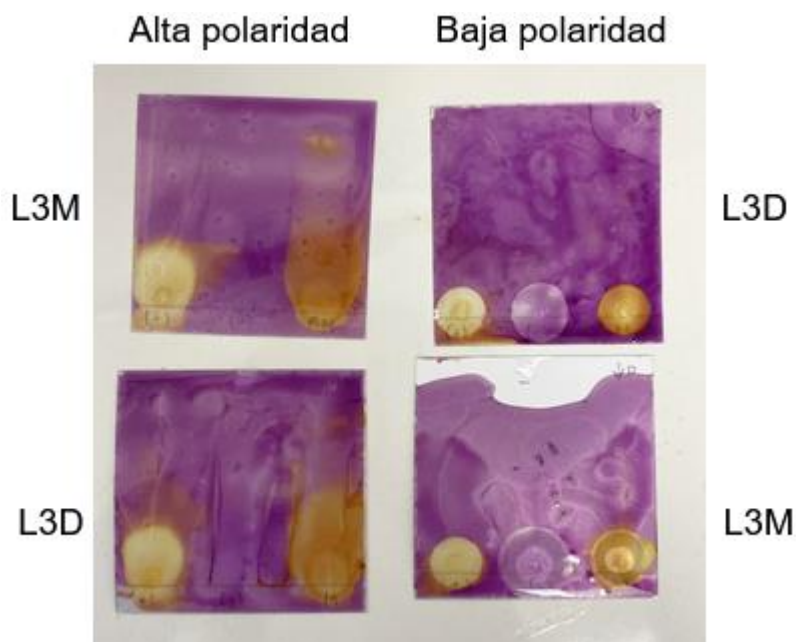


Figura 21. Placas de sílica sembradas con vitamina C (+), PEG (-) y los extractos L3D y L3M, luego de ser eluidas con solventes de alta y baja polaridad y reveladas con DPPH.

II. Método cuantitativo DPPH

Las absorbancias obtenidas pasados los 20 minutos que indica el ensayo, fueron utilizadas para aplicar la ecuación 5. Una vez aplicada, los resultados del efecto AOX de L3D resultó en un valor de $30,13 \pm 1,17\%$ de inhibición de radicales libres de DPPH a una concentración de 50 mg/mL de extracto, mientras que el efecto AOX de L3M resultó en un valor de $30,06 \pm 1,55\%$ de inhibición, a la misma concentración. Los resultados obtenidos indican que tanto el extracto L3D como el L3M presentan actividad antioxidante con valores muy similares entre sí, lo que sugiere que, a esta concentración, ambos extractos tienen una eficacia comparable para neutralizar radicales libres.

El ensayo de DPPH se basa en la capacidad de ciertos compuestos antioxidantes para donar un electrón o un átomo de hidrógeno al radical estable DPPH•, generando una disminución en la absorbancia a 517 nm. Por lo tanto, estos resultados permiten inferir que ambos extractos contienen compuestos con capacidad reductora, capaces de estabilizar radicales libres mediante transferencia de electrones o protones [100]. A comparación con los trabajos de López y Caballero [55, 66] que registraron una actividad AOX de $22,93 \pm 4,81\%$ y $12,8 \pm 4,97\%$ a una concentración de 5 mg/mL de extracto hidroetanólico seco, los extractos L3D y L3M presentaron un potencial antioxidante considerablemente superior. Es por ello que la magnitud de inhibición observada puede considerarse como indicativa de una actividad antioxidante intermedia, especialmente si se compara con antioxidantes de referencia como el ácido ascórbico o el BHT, los cuales pueden reducir los radicales libres hasta un 50% en concentraciones tan bajas como 4.2 µg/ml y 13.5 µg/ml respectivamente [101].

El hecho de que ambos extractos presenten una inhibición casi idéntica sugiere que podrían compartir una composición fitoquímica semejante en cuanto a sus compuestos fenólicos o flavonoides, grupos mayoritariamente responsables de la actividad antioxidante en extractos vegetales. Esto concuerda con estudios previos que han relacionado la presencia de flavonoides, taninos y otros polifenoles con la capacidad de eliminar radicales libres.

Sin embargo, es importante considerar que el DPPH es un ensayo *in vitro* y mide únicamente un tipo específico de actividad antioxidante (donación de hidrógeno), por lo que estos valores no reflejan necesariamente la eficacia en sistemas biológicos más complejos. Además, dado que la concentración usada fue relativamente alta (50 mg/mL), sería relevante realizar una curva dosis-respuesta para determinar la concentración mínima eficaz (IC₅₀) y poder comparar de forma más objetiva el poder antioxidante de cada extracto.

Finalmente, la baja desviación estándar en ambos casos indica buena reproducibilidad del ensayo, lo que da solidez a los resultados obtenidos. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial uso de los extractos L3D y L3M como fuentes de antioxidantes naturales, aunque serían necesarios estudios adicionales, como la evaluación en otros modelos antioxidantes complementarios (por ejemplo, ORAC), para tener una visión más completa de su actividad.

10) Elaboración de formulación tópica con extracto en PEG de *L. medicinalis*

Para la elaboración de la formulación tópica, se eligió carbopol como polímero gelificante debido a su capacidad de formar geles ideales para aplicaciones cosméticas. También, se decidió utilizar glicerina y propilenglicol como excipientes humectantes [102], además de parabenos para asegurar la conservación del gel en el tiempo. Todos estos ingredientes fueron compatibles para usar como vehículo para los extractos en PEG de lampayo.

Para definir las concentraciones de cada uno de los ingredientes del vehículo para los extractos, se tomaron como referencia los porcentajes comúnmente utilizado de los mismos

en preparaciones cosméticas [102]. En el caso del carbopol, se suele usar de 0,5-2% de polímero, por lo que se prepararon geles con 0,3 a 0,6% para definir la consistencia deseada. Para la glicerina, se suele utilizar una concentración menor a 20% en aplicaciones cosméticas, por lo que se decidió probar con una concentración baja (3-5%) puesto que a concentraciones más altas dejó una sensación pegajosa en la piel. El propilenglicol también se suele utilizar a concentraciones menores al 20%, por lo tanto, se decidió probar con una concentración de 5-7% debido a que a esa concentración el excipiente logró aportar una sensación de “toque seco” al ser aplicado en la piel. Para incorporar los parabenos a la formulación, se preparó agua conservante según las indicaciones del formulario nacional [103], y para definir el porcentaje a añadir de los extractos, se tomó como referencia la MIC (25 mg), resultando en un 10% del peso final de la formulación.

Después de probar distintas combinaciones de concentraciones del polímero y los demás ingredientes, se decidió por utilizar 0,6% de carbopol, 3% de glicerina, 7% de propilenglicol, 10% de los extractos y agua conservante en cantidad suficiente para 50 g. Se preparó un gel para L3D y un gel para L3M, a los que se les ajustó el pH a 6 con trietanolamina (Figura 22).

Por último, se midió la viscosidad de ambos geles con un viscosímetro rotacional de Brookfield, obteniendo un valor de 12.400 mPas para cada uno.

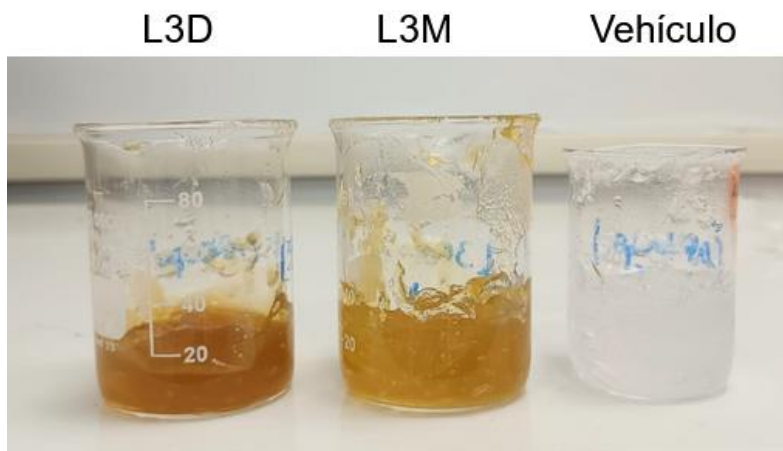


Figura 22. Aspecto de los geles elaborados con la formulación final.

La decisión de formular un gel cosmético con cada uno de los extractos en vez de una emulsión se basa en consideraciones tanto dermatológicas como tecnológicas. En primer lugar, las personas con piel acnéica tienden a presentar una producción excesiva de sebo, lo que resulta en una piel grasa con tendencia a la obstrucción de los poros. El uso de formulaciones con fases oleosas, como las emulsiones tradicionales (especialmente tipo O/W o W/O con alto contenido graso), podría agravar esta condición, promoviendo la formación de comedones y brotes acnéicos. Por lo tanto, el uso de un gel acuoso, libre de lípidos, con muy baja carga grasa, resulta más adecuado para este tipo de piel.

Desde el punto de vista tecnológico, la formulación de un gel ofrece la ventaja de poder prepararse a temperatura ambiente o mediante procesos en frío. Esto es especialmente importante en este caso, debido a que permite preservar la estabilidad y la integridad de los compuestos bioactivos extraídos desde el lampayo, los cuales podrían ser sensibles al calor (como algunos flavonoides, ácidos fenólicos o alcaloides termosensibles). En cambio, la elaboración de emulsiones generalmente requiere fases calientes que superan los 60 °C, lo que incrementa el riesgo de degradación de estos principios activos.

Además, la base acuosa de los geles favorece una buena hidratación superficial de la piel, lo que también es relevante en el tratamiento del acné. Aunque pueda parecer contradictorio, la piel acneica puede presentar deshidratación, especialmente cuando se somete a tratamientos secantes como peróxido de benzoilo, retinoides o antibióticos tópicos. Esta deshidratación puede inducir una sobrecompensación por parte de las glándulas sebáceas, aumentando la producción de sebo [104]. Por esta razón, el uso de productos hidratantes libres de aceite, con buena capacidad humectante y emoliente, como los geles cosméticos con glicerina, propilenglicol o pantenol, puede ayudar a mantener el equilibrio hídrico de la piel sin obstruir los poros ni fomentar la formación de nuevas lesiones.

Es por estos factores que se justifica el uso de una formulación en gel para el cuidado de pieles con tendencia acneica, maximizando la estabilidad y eficacia del extracto vegetal utilizado.

11) Actividad fotoprotectora

I. Estimación del factor de protección solar del extracto en PEG y las formulaciones de *L. medicinalis*

Al aplicar la ecuación de Mansur a las absorbancias de los extractos, se obtuvo que el extracto L3D arrojó un valor estimado de 11,97 FPS, y L3M arrojó un valor de 11,79 FPS. En el caso de los geles cosméticos, al aplicar la ecuación se obtuvo un valor para el gel L3D de 12,13 FPS, y uno de 11,94 FPS para el gel L3M.

El Factor de Protección Solar (FPS) es una medida que indica cuántas veces un producto fotoprotector aumenta la capacidad natural de la piel para resistir el enrojecimiento o eritema causado por la radiación UV, principalmente UVB. Por ejemplo, un FPS 15 permite que solo 1/15 de la radiación UVB alcance la piel, es decir, bloquea aproximadamente un 93% de esta radiación. A modo comparativo, un FPS 30 bloquea un 97%, y un FPS 50 cerca de un 98% de la radiación UVB.

Según la clasificación establecida por la Comisión Europea y otras agencias internacionales, los productos con FPS entre 6 y 10 se consideran de baja protección, entre 15 y 25 de protección media, y los superiores a 30 como de alta o muy alta protección [105].

En este contexto, los extractos L3D y L3M presentaron valores de FPS estimados que se ubican dentro del rango de protección media a baja, lo que indica que, si bien no ofrecen una protección comparable a la de los bloqueadores solares comerciales de amplio

espectro, sí proporcionan un cierto nivel de defensa frente a la radiación UVB. Esto es especialmente relevante considerando que los tratamientos convencionales para el acné, como el peróxido de benzoilo o los retinoides tópicos, no contienen componentes con efecto fotoprotector intrínseco, y de hecho, pueden aumentar la fotosensibilidad de la piel, haciendo necesario el uso complementario de fotoprotectores.

Cabe señalar que los valores de FPS obtenidos fueron calculados mediante la ecuación propuesta por Mansur & col., que estima el FPS *in vitro* a partir de la absorbancia de las muestras en la región UVB (290–320 nm). Este método proporciona un valor teórico o estimado, que no sustituye al FPS *in vivo*, el cual se determina por métodos estandarizados que evalúan el eritema inducido en voluntarios humanos tras la exposición solar controlada.

El potencial fotoprotector de los extractos podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos, como flavonoides y cumarinas, conocidos por su capacidad de absorber radiación en las longitudes de onda de UVA (320–400 nm) y UVB (290–320 nm). Estos metabolitos secundarios no solo actúan como filtros solares naturales al absorber y disipar la energía UV, sino que también presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, ayudando a neutralizar el estrés oxidativo inducido por la radiación solar.

En resumen, si bien los geles preparados con L3D y L3M no serían adecuados como protectores solares únicos, podrían ser un complemento dentro de formulaciones tópicas destinadas a pieles con tendencia acnéica, especialmente por su capacidad de proporcionar cierto grado de fotoprotección natural y antioxidante, lo que no suele estar presente en los tratamientos tradicionales para el acné.

12) Desarrollo de modelo de piel sintética

Los datos que fueron ingresados al software JMP, fueron aquellos de humedad y elasticidad obtenidos al quinto día de las mediciones. Esto debido a que fue el día que menos variabilidad presentaron los datos. Se compararon las variables de humedad y elasticidad con respecto a las diferentes proporciones de gelatina, glicerina y formaldehído, y se obtuvo que para la humedad hubo un $R^2=0,90$ y para la elasticidad un $R^2=0,91$, lo que indica que sí hubo una correlación entre las diferentes concentraciones de los tres ingredientes con la variación de humedad y elasticidad de las 15 pieles hechas.

Los datos fueron graficados (Figura 24) y se eligieron las variables que más asemejaran a las obtenidas de piel real. Es por esto que se seleccionó una concentración de 40% de glicerina, 5% de gelatina y 0,5% de formaldehído para hacer la piel que fue utilizada en la prueba de fotoprotección con las tarjetas UV.

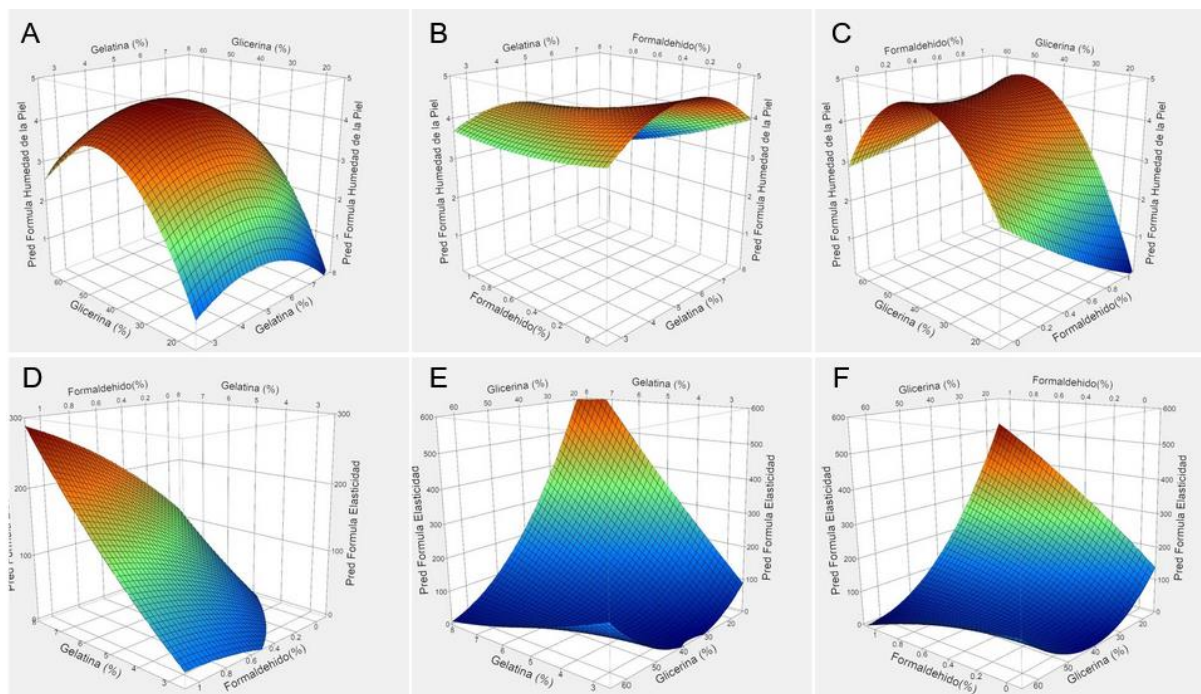


Figura 23. Gráficos realizados que relacionan las concentraciones de gelatina, glicerina y formaldehído con la humedad y elasticidad de las pieles artificiales. (A) Relación entre gelatina y glicerina con la humedad. (B) Relación entre gelatina y formaldehído con la humedad. (C) Relación entre glicerina y formaldehído con la humedad. Las zonas rojas son las que se consideraron para la elección debido a que predecían mayor humedad a esas concentraciones. (D) Relación entre gelatina y glicerina con la elasticidad. (E) Relación entre gelatina y formaldehído con la elasticidad. (F) Relación entre glicerina y formaldehído con la elasticidad. En este caso se consideraron las zonas azules para simular la elasticidad, debido a que un menor valor de N/m significa mayor elasticidad.

Se eligieron esos porcentajes porque según el modelo predictivo, se obtendría una humedad de aproximadamente 5 (el mayor valor obtenido experimentalmente) y una elasticidad de 70 N/m, muy parecida a la de la piel real. El formaldehído no influyó de manera significativa en ambas variables, aunque igualmente se seleccionó una concentración intermedia.

A pesar de las múltiples formulaciones ensayadas, no fue posible obtener valores de humedad superficial más elevados, incluso al aplicar vehículos como el gel de lampayo. Este comportamiento puede explicarse por la constante dieléctrica baja generada por la mezcla base de gelatina y glicerina. Aunque ambos compuestos son higroscópicos y poseen cierta capacidad de retención hídrica, la señal medida por el equipo MoistureMeter® se basa en la constante dieléctrica del material. Es decir, no basta con que un material retenga agua; también debe poseer una constante dieléctrica suficientemente elevada como para que dicha retención sea detectada por el equipo.

En este contexto, materiales como la lecitina de soya, urea, sales como NaCl o biopolímeros como goma xantana podrían representar aditivos prometedores, debido que estos no solo aumentarían la capacidad del sistema para retener agua, sino que también podrían mejorar la respuesta dieléctrica del modelo de piel artificial, haciéndolo más sensible y realista frente a las mediciones instrumentales. De hecho, se iniciaron pruebas preliminares con formulaciones mejoradas que incluían algunos de estos compuestos, observándose un comportamiento favorable: en lugar de requerir cinco días de hidratación para alcanzar niveles detectables de humedad superficial (como ocurría con la mezcla original), estas nuevas formulaciones mostraban respuestas positivas al MoistureMeter® desde el día siguiente. Sin embargo, debido a un desperfecto técnico en el computador con el que se hicieron las mediciones, los datos cuantitativos asociados a dichas pruebas se perdieron, lo que impide respaldar empíricamente estas observaciones.

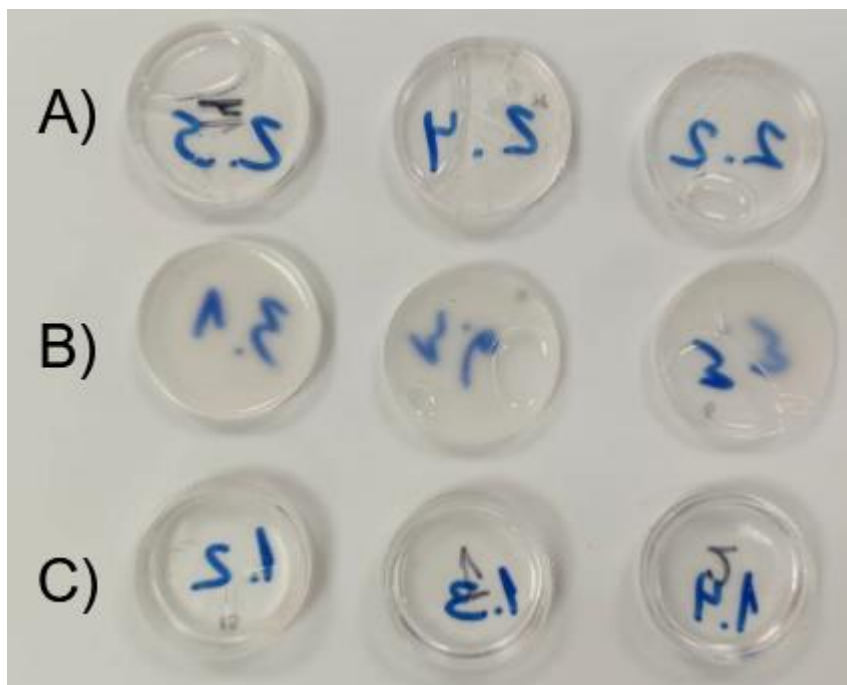


Figura 24. Aspecto de las pieles artificiales en sus respectivas placas petri. (A) Pieles mejoradas sin lecitina de soya. (B) Pieles mejoradas con lecitina de soya. (C) Piel base de gelatina, glicerina y formaldehído.

Aun así, los resultados obtenidos a lo largo de la aplicación del diseño experimental resaltan el potencial de esta metodología para el desarrollo de modelos de piel artificial replicables en laboratorio. El enfoque empleado, utilizando ingredientes comunes, seguros y fácilmente manipulables, representa una alternativa viable para la evaluación preliminar de productos cosméticos, especialmente en contextos donde no se desea o no se puede utilizar piel humana o animal. La mejora en la sensibilidad dieléctrica del modelo representa un área crítica para futuras investigaciones, y abre la posibilidad de optimizar esta plataforma hacia

modelos cutáneos más complejos, que simulen no solo parámetros físicos como humedad y elasticidad, sino también permeabilidad, interacción con ingredientes bioactivos y estabilidad frente a formulaciones tópicas.

I. Evaluación cualitativa de la fotoprotección

Para evaluar la capacidad fotoprotectora, las fotos tomadas de las tarjetas UV fueron analizadas digitalmente mediante ImageJ, utilizando la descomposición en canales RGB y el análisis en escala de grises. Los resultados mostraron que todos los tratamientos con extractos y formulaciones generaron valores de luminosidad promedio (“Mean”) superiores al control negativo expuesto directamente a radiación UV (97.901), lo que indica una mayor claridad del color y, por ende, una mayor protección. Los resultados del análisis se resumen en la Figura 23 y Tabla 11:

	Color	Rojo	Verde	Azul
Gel L3D				
Extracto L3D				
Gel L3M				
Extracto L3M				
Control filtros solares				
Control piel				
Control exposición directa				

Figura 25. Variación en la intensidad de color de las tarjetas UV con diferentes tratamientos de fotoprotección.

Tabla 11. Valores obtenidos al realizar el análisis en escala de grises de la fotoprotección cualitativa de diferentes tratamientos por ImageJ.

Tratamiento	Rojo	Verde	Azul	Promedio RGB
Gel L3D	137.134	87.121	151.283	125.179
Extracto L3D	135.671	85.240	150.415	123.775
Gel L3M	134.941	84.497	149.909	123.116
Extracto L3M	130.802	77.152	145.192	117.715
Control filtros solares	125.830	74.541	139.202	113.191
Control piel	122.755	65.759	140.882	109.799
Control exposición directa	114.617	56.785	122.300	97.901

Destacaron especialmente el gel con extracto L3D (125.179) y el extracto L3D aplicado directamente (123.775), los cuales superaron incluso al control positivo con filtros solares (113.191). De manera similar, el extracto y gel L3M también presentaron valores superiores al control gelatinoso sin extracto (“control piel”, 109.799). Estos resultados sugieren que los extractos L3D y L3M, especialmente en su formulación en gel, tienen un efecto fotoprotector potencialmente comparable al de los filtros solares usados en las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, es importante destacar que este método tiene un carácter predominantemente cualitativo, ya que, si bien permite comparar la intensidad relativa del oscurecimiento de las tarjetas UV tratadas con distintas muestras, no entrega un valor directo de absorbancia o índice de protección, como sí lo harían métodos espectrofotométricos o pruebas *in vivo* bajo normativas específicas (como COLIPA o FDA para FPS).

Además, las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el experimento no reproducen fielmente la situación real de exposición solar. La fuente de radiación UV empleada en laboratorio probablemente emite una intensidad mucho mayor que la recibida por la piel humana bajo exposición natural, ya que en condiciones reales la radiación solar llega atenuada por la atmósfera y filtrada por distintos factores ambientales (latitud, nubosidad, ozono, hora del día, entre otros). En el sistema experimental, la distancia entre la fuente de UV y la muestra suele ser mínima para asegurar la reacción de la tarjeta UV en tiempos controlados, pero eso implica una sobrecarga de radiación respecto a la exposición solar natural.

Otro aspecto a considerar es la naturaleza de las tarjetas UV, las cuales cambian de color en función de la radiación recibida, pero su sensibilidad puede variar entre lotes o estar influenciada por la temperatura, humedad o grosor de la capa aplicada. Asimismo, el análisis mediante ImageJ, aunque robusto y reproducible, depende de factores como la iluminación de la fotografía, la calibración de color de la cámara, y la homogeneidad de la superficie analizada.

A pesar de las limitaciones, la metodología utilizada sí permitió establecer que los extractos vegetales evaluados, en especial L3D, son capaces de reducir la exposición a radiación UV en condiciones experimentales controladas, lo que sugiere la presencia de compuestos con propiedades absorbentes de UV o reflectantes, como flavonoides, taninos, ácidos fenólicos o cumarinas. El experimento no permitió establecer un valor numérico de fotoprotección (como un FPS), pero sí respaldó el potencial uso de los extractos L3D y L3M como ingredientes fotoprotectores.

5. Conclusión

Los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico, reveló que *Lampayo medicinalis* contiene una diversa gama de metabolitos secundarios, incluyendo flavonoides, cumarinas, taninos, triterpenos y compuestos fenólicos. Estos compuestos no solo explicarían su efecto antibacteriano, sino que además justificarían las actividades antioxidantes, antiinflamatorias y fotoprotectoras observadas experimentalmente, todas ellas fundamentales en el enfoque terapéutico integral del acné.

Asimismo, se demostró que *L. medicinalis* posee efectivamente actividad antibacteriana frente a *Cutibacterium acnes*, una de las principales bacterias implicadas en la fisiopatología del acné. Esta actividad fue selectiva, ya que la acción antimicrobiana se manifestó con mayor potencia frente a *C. acnes* en comparación con otras bacterias cutáneas como *S. epidermidis* y *S. aureus*. Este hallazgo resulta particularmente relevante en el contexto terapéutico, dado que la selectividad antimicrobiana es un atributo altamente deseable para evitar disbiosis en la microbiota cutánea y empeorar la condición del acné.

Por otro lado, la extracción realizada con PEG400 resultó ser altamente eficiente, permitiendo la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos, con mínimas diferencias en composición y actividad biológica en diferentes tiempos de extracción (tres días y tres meses) lo que sugiere que es posible reducir significativamente los tiempos de extracción sin comprometer la calidad del extracto. Este solvente demostró ser una opción segura, versátil y compatible con formulaciones cosméticas, lo cual lo posiciona como un excelente vehículo para el desarrollo de productos tópicos.

En relación con el modelo de piel artificial desarrollado, se logró obtener un sistema que, aunque con respuesta leve, fue capaz de mostrar una respuesta detectable a la hidratación, lo que valida parcialmente su utilidad como plataforma experimental para la evaluación preliminar de propiedades cosméticas como la humectación o la fotoprotección. Si bien aún requiere optimización, particularmente en cuanto a su capacidad dieléctrica y sensibilidad, representa una base prometedora y replicable para futuros estudios *in vitro*, sin necesidad de recurrir a modelos animales o humanos.

En conjunto, los resultados de esta investigación destacan el alto potencial biológico y tecnológico de *Lampayo medicinalis*, tanto como agente antiacné, fotoprotector y antioxidante, como también como fuente de compuestos bioactivos de interés farmacológico y cosmético. No obstante, será indispensable avanzar hacia estudios *in vivo* en sujetos humanos que permitan validar la eficacia y seguridad de estos extractos en condiciones fisiológicas reales, así como su verdadera capacidad fotoprotectora, además de realizar más estudios sobre la composición del lampayo y la posibilidad de aislar y sintetizar los metabolitos con la acción biológica de interés, con el objetivo de prácticas que puedan generar una depredación del recurso.

6. Bibliografía

1. Samuels, D. V., Rosenthal, R., Lin, R., Chaudhari, S., & Natsuaki, M. N. (2020). Acne vulgaris and risk of depression and anxiety: A meta-analytic review. *Journal Of The American Academy Of Dermatology*, 83(2), 532-541. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.02.040>
2. Lynn, D., Umari, T., Dellavalle, R., & Dunnick, C. (2016). The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. *Adolescent Health Medicine And Therapeutics*, 13. <https://doi.org/10.2147/ahmt.s55832>
3. Hazarika, N. (2019). Acne vulgaris: new evidence in pathogenesis and future modalities of treatment. *Journal Of Dermatological Treatment*, 32(3), 277-285. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1654075>
4. O'Neill, A. M., & Gallo, R. L. (2018). Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0558-5>
5. Dréno, B., Dagnelie, M. A., Khammari, A., & Corvec, S. (2020). The Skin Microbiome: A New Actor in Inflammatory Acne. *American Journal Of Clinical Dermatology*, 21(S1), 18-24. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00531-1>
6. Cavallo, I., Sivori, F., Truglio, M., De Maio, F., Lucantoni, F., Cardinali, G., Pontone, M., Bernardi, T., Sanguinetti, M., Capitanio, B., Cristaudo, A., Ascenzioni, F., Morrone, A., Pimpinelli, F., & Di Domenico, E. G. (2022). Skin dysbiosis and *Cutibacterium acnes* biofilm in inflammatory acne lesions of adolescents. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25436-3>
7. Xu, H., & Li, H. (2019). Acne, the Skin Microbiome, and Antibiotic Treatment. *American Journal Of Clinical Dermatology*, 20(3), 335-344. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-00417-3>
8. Ballanger-Desolneux, F., & Dreno, B. (2011). Acné. *EMC - Pédiatrie*, 46(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/s1245-1789\(11\)71003-4](https://doi.org/10.1016/s1245-1789(11)71003-4)
9. Morales M, J. C. (2017). Tratamiento Farmacológico del Acné en APS (S. Rivera M, Ed.). *Escuela de Medicina UC*. <https://medicina.uc.cl/publicacion/tratamiento-farmacologico-del-acne-en-aps/>
10. Fox, L., Csongradi, C., Aucamp, M., Du Plessis, J., & Gerber, M. (2016). Treatment Modalities for Acne. *Molecules*, 21(8), 1063. <https://doi.org/10.3390/molecules21081063>

11. Habeshian, K. A., & Cohen, B. A. (2020). Current Issues in the Treatment of Acne Vulgaris. *PEDIATRICS*, 145(Supplement_2), S225-S230. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-20561>
12. Arif, T. (2015). Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. *Clinical Cosmetic And Investigational Dermatology*, 455. <https://doi.org/10.2147/ccid.s84765>
13. Azelaic Acid: Evidence-based Update on Mechanism of Action and Clinical Application. (2015). PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26355614/>
14. DermNet. (2023). Azelaic acid. DermNet®. <https://dermnetnz.org/topics/azelaic-acid>
15. Sharad, J. (2013). Glycolic acid peel therapy & a current review. *Clinical Cosmetic And Investigational Dermatology*, 281. <https://doi.org/10.2147/ccid.s34029>
16. Mukherjee, S., Date, A., Patravale, V., Korting, H. C., Roeder, A., & Weindl, G. (2006). Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical Interventions In Aging*, 1(4), 327-348. <https://doi.org/10.2147/cia.2006.1.4.327>
17. Khalil, S., Bardawil, T., Stephan, C., Darwiche, N., Abbas, O., Kibbi, A. G., Nemer, G., & Kurban, M. (2017). Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *Journal Of Dermatological Treatment*, 28(8), 684-696. <https://doi.org/10.1080/09546634.2017.1309349>
18. Ávalos, A., Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145. <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798/814>
19. Hersch, P. (2008). SINERGIA Y CONTEXTO: Elementos clave en la acción terapéutica de las plantas... y a su vez, referentes también en el necesario debate actual sobre nuestros recursos naturales. <https://revistas.inah.gob.mx/index.php/eltlacuache/issue/download/issue%201773/issue%201773>
20. Ministerio de Salud de Chile. (2009). Medicamentos Herbarios Tradicionales. <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/02/Libro-MHT-2010.pdf>
21. Acevedo de Vargas, R. (1950). Índice específico de las Verbenáceas chilenas del Museo de Historia Natural. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Chile* 25: 35-72 (1950-1951)
22. Jaradat, N., Hawash, M., Abualhasan, M., Qadi, M., Ghanim, M., Massarwy, E., Ammar, S. A., Zmero, N., Arar, M., Hussein, F., Issa, L., Mousa, A., & Zarour, A. (2021). Spectral characterization, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and cyclooxygenase inhibitory activities of *Aloysia citriodora* essential oils collected from

- two Palestinian regions. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03314-1>
23. Morales, G., & Paredes, A. (2014). Antioxidant activities of *Lampaya medicinalis* extracts and their main chemical constituents. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-259>
 24. Sampietro, D., Lizarraga, E., Ibatayev, Z., Omarova, A., Suleimen, Y., Catalán, C. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Acantholippia deserticola*, *Artemisia proceriformis*, *Achillea micrantha* and *Libanotis buchtormensis* against phytopathogenic bacteria and fungi, *Natural Product Research*. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1091453>
 25. Vestena, A. S., Piton, Y., De Loretto Bordignon, S. A., Garcia, S. C., Arbo, M. D., Zuanazzi, J. Â. S., & Von Poser, G. (2019). Hepatoprotective activity of *verbena litoralis*, *Verbena montevidensis* and their main iridoid, brasoside. *Journal of Ethnopharmacology*, 239, 111906. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111906>
 26. Chileflora. (s. f.). Descripción e imágenes de *Lampaya medicinalis*. <https://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH1234.htm>
 27. Eissa, M. A., Hashim, Y. Z. H., Azziz, S. S. S. A., Salleh, H. M., Isa, M. L. M., Warif, N. M. A., Abdullah, F., Ramadan, E., & El-Kersh, D. M. (2022). Phytochemical Constituents of *Aquilaria malaccensis* Leaf Extract and Their Anti-Inflammatory Activity against LPS/IFN- γ -Stimulated RAW 264.7 Cell Line. *ACS Omega*, 7(18), 15637-15646. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00439>
 28. Martini, N., Katerere, D., & Eloff, J. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal Of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.030>
 29. Ninomiya, K., Matsumoto, T., Chaipetch, S., Miyake, S., Katsuyama, Y., Tsuboyama, A., Pongpiriyadacha, Y., Hayakawa, T., Muraoka, O., & Morikawa, T. (2015). Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Journal of Natural Medicines*, 70(2), 179-189. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0955-z>
 30. Jung, S., Heo, H., Choe, J., Kim, J. H., & Lee, K. (2021). Anti-Melanogenic properties of velutin and its analogs. *Molecules*, 26(10), 3033. <https://doi.org/10.3390/molecules26103033>
 31. Xie, C., Kang, J., Li, Z., Schauss, A. G., Badger, T. M., Nagarajan, S., Wu, T., & Wu, X. (2012). The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(9), 1184-1191. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.013>

32. Ramos, A. V. G., De Sá, N., Araújo, D. L. O., Cabral, M. R. P., Costacurta, G. F., De Freitas, B. C., Vilegas, L. V., De Lima Scodro, R. B., Siqueira, V. L. D., Cotica, E. S. K., Carmo, M. R. B. D., Sarragiotto, M. H., & Baldoqui, D. C. (2021). The chemistry of *Vernonanthura nudiflora* (Less.) H. Rob. flowers and its antimicrobial activities. *Natural Product Research*, 37(3), 502-507. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1980790>
33. Ai, M., Lin, S., Zhang, M., Wu, T., Yang, N., Yu, L., & Li, L. (2021). Cirsilineol attenuates LPS-induced inflammation in both in vivo and in vitro models via inhibiting TLR-4/NF κ B/IKK signaling pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(8). <https://doi.org/10.1002/jbt.22799>
34. Isobe, T., Doe, M., Morimoto, Y., Nagata, K., & Ohsaki, A. (2006). The Anti-*Helicobacter pylori* Flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis fasciculata*, and the Activity of Methoxyflavones. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 29(5), 1039-1041. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1039>
35. Ching-Wen, C., Yun-Chieh, C., Yu-Chin, L., & Wen-Huang, P. (2017). P-Hydroxyacetophenone suppresses nuclear factor- κ B-related inflammation in nociceptive and inflammatory animal models. *Journal Of Natural Medicines*, 71(2), 422-432. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1074-9>
36. Kesari, K. K., Dhasmana, A., Shandilya, S., Prabhakar, N., Ahmed, S. T., Dou, J., Rosenholm, J. M., Vuorinen, T., & Ruokolainen, J. (2020). Plant-Derived natural biomolecule PICEin attenuates menadione induced oxidative stress on neuroblastoma cell mitochondria. *Antioxidants*, 9(6), 552. <https://doi.org/10.3390/antiox9060552>
37. Koo, H., Lim, K., Jung, H., & Park, E. (2006). Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and Genipin. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(3), 496-500. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.011>
38. Huertas-Bello, M., Cuéllar-Sáenz, J. A., Rodriguez, C. N., Cortés-Vecino, J. A., Navarrete, M. L., Avila, M. Y., & Koudouna, E. (2023). A Pilot Study to Evaluate Genipin in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis Models: Modulation of Pro-Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(8), 6904. <https://doi.org/10.3390/ijms24086904>
39. Sanhueza, S., Tobar, N., Cifuentes, M., Quenti, D., Varì, R., Scazzocchio, B., Masella, R., Herrera, K., Paredes, A., Morales, G., & Ormazabal, P. (2021). *Lampaya Medicinalis* Phil. decreases lipid-induced triglyceride accumulation and proinflammatory markers in human hepatocytes and fat body of *Drosophila melanogaster*. *International Journal Of Obesity*, 45(7), 1464-1475. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00811-8>

40. Ormazabal, P., Cifuentes, M., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R., Pacheco, I., Vega, W., Paredes, A., & Morales, G. (2020). Hydroethanolic Extract of *Lampaya Medicinalis* Phil. (Verbenaceae) Decreases Proinflammatory Marker Expression in Palmitic Acid-exposed Macrophages. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 20(8), 1309-1320. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200513082300>
41. Yuri, G., Cifuentes, M., Cisternas, P., Paredes, A., & Ormazabal, P. (2024). Effect of *Lampaya medicinalis* Phil. (Verbenaceae) and Palmitic Acid on Insulin Signaling and Inflammatory Marker Expression in Human Adipocytes. *Pharmaceuticals*, 17(5), 566. <https://doi.org/10.3390/ph17050566>
42. Morales, G., Paredes, A., Olivares, A., & Bravo, J. (2014). Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extract from *Lampaya medicinalis* Phil in rats. *Biological Research*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-6>
43. Davis, E. C., & Callender, V. D. (2010, 1 julio). Postinflammatory Hyperpigmentation: A Review of the Epidemiology, Clinical Features, and Treatment Options in Skin of Color. PubMed Central (PMC). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2921758/>
44. Arican, O., Kurutas, E. B., & Sasmaz, S. (2005). Oxidative Stress in Patients With Acne Vulgaris. *Mediators Of Inflammation*, 2005(6), 380-384. <https://doi.org/10.1155/mi.2005.380>
45. Gajardo, S., Aguilar, M., Stowhas, T., Salas, F., Lopez, J., Quispe, C., Buc-Calderon, P., & Benites, J. (2016, 30 septiembre). Determinación del factor de protección solar y propiedades antioxidante de seis plantas del Altiplano Chileno. <https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/287>
46. AIM At Melanoma Foundation (2024). Radiación ultravioleta (UV): objetivo de la Fundación para el Melanoma. <https://www.aimatmelanoma.org/es/Melanoma-101/prevenci%C3%B3n/%C2%BFQu%C3%A9-es-la-radiaci%C3%B3n-ultravioleta-UV%3F/>
47. Ghazi, S. (2022). Do the polyphenolic compounds from natural products can protect the skin from ultraviolet rays? *Results In Chemistry*, 4, 100428. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100428>
48. Hoffmann, M. M. (2021). Polyethylene glycol as a green chemical solvent. *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 57, 101537. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101537>
49. Šuran, J., Cepanec, I., Mašek, T., Starčević, K., Gajger, I. T., Vranješ, M., Radić, B., Radić, S., Kosalec, I., & Vlainić, J. (2021). Nonaqueous Polyethylene Glycol as a Safer Alternative to Ethanolic Propolis Extracts with Comparable Antioxidant and

- Antimicrobial Activity. Antioxidants, 10(6), 978.
<https://doi.org/10.3390/antiox10060978>
50. Seker, A., Arslan, B., & Chen, S. (2019). Recovery of Polyphenols from Grape Pomace Using Polyethylene Glycol (PEG)-Grafted Silica Particles and PEG-Assisted Cosolvent Elution. *Molecules*, 24(12), 2199.
<https://doi.org/10.3390/molecules24122199>
 51. L Alborno, P. (s. f.). Técnicas histológicas vegetal. HISTO–NOA, Histoteca Vegetal Virtual de la Facultad de Ciencias Naturales E Instituto Miguel Lillo-UNT.
 52. García-Granados, R. U., Cruz-Sosa, F., Alarcón-Aguilar, F. J., Nieto-Trujillo, A., & Gallegos-Martínez, M. E. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum banks ex köning et sims* de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. *Polibotánica*, (48), 151-168.
 53. Bulugahapitiya, V. P. (2013). Plants based natural products extraction, isolation and phytochemical screening methods. Department of Chemistry, University of Ruhuna, Sri Lanka.
 54. Bermejo de Zaa, A. D. L. Á., Pereira Cabrera, S., Cintra Jorge, M. L., & Morales Torres, G. (2014). Determinación de parámetros químico-físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 13(5), 670-680.
 55. López, A., & Vera, W (2023). DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DE *LAMPAYO MEDICINALIS* (VERBENACEAE) [Tesis de pregrado no publicada]. Universidad de Valparaíso.
 56. Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience*.
 57. Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111932>
 58. Castillo, D., & Vera, W. (2022). EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE GC-MS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Lampayo medicinalis* F. PHIL (VERBENACEAE) CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA.) [Tesis de pregrado no publicada]. Universidad de Valparaíso.
 59. Tripathi, N., Zubair, M., & Sapra, A. (2025, 28 marzo). Gram staining. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK562156/>

60. Baquero, L. C. P., Gordillo, J. V., Fernández, M. R. R., Arias, R. S., & Rodríguez, P. H. (2013). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro especies agroforestales de la Orinoquía colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 57–70. <http://scielo.sld.cu57>
61. Zúñiga-López, M. C., Maturana, G., Campmajó, G., Saurina, J., & Núñez, O. (2021). Determination of Bioactive Compounds in Sequential Extracts of Chia Leaf (*Salvia hispanica* L.) Using UHPLC-HRMS (Q-Orbitrap) and a Global Evaluation of Antioxidant In Vitro Capacity. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10071151>
62. Sayre R.M., Agin P.P., Levee G.I., Marlowe E.. Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochem. Photobiol.* 559–566(1979).
63. Keshavarzi, F., Knudsen, N. Ø., Brewer, J. R., Ebbesen, M. F., Komjani, N. M., Moghaddam, S. Z., Jafarzadeh, S., & Thormann, E. (2021). In vitro skin model for characterization of sunscreen substantivity upon perspiration. *International Journal Of Cosmetic Science*, 43(3), 359-371. <https://doi.org/10.1111/ics.12703>
64. Lir, I., Haber, M., & Dodiuk-Kenig, H. (2007). Skin surface model material as a substrate for adhesion-to-skin testing. *Journal Of Adhesion Science And Technology*, 21(15), 1497-1512. <https://doi.org/10.1163/156856107782844783>
65. Deng, Y., Winter, G., & Myschik, J. (2012). Preparation and validation of a skin model for the evaluation of intradermal powder injection devices. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 81(2), 360-368. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.03.008>
66. Caballero, C., Vera, W., Escobar, M. (2024). CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS NO VOLÁTILES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Lampayo medicinalis* F. PHIL (VERBENACEAE). [Tesis de pregrado no publicada]. Universidad de Valparaíso.
67. Prasedya, E. S., Frediansyah, A., Martyasari, N. W. R., Ilhami, B. K., Abidin, A. S., Padmi, H., Fahrurrozi, N., Juanssilfero, A. B., Widyastuti, S., & Sunarwidhi, A. L. (2021). Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of *Sargassum cristaefolium* ethanol extract. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95769-y>
68. Senawong, K., Katekaew, S., Juntahum, S., & Laloan, K. (2023). Impact of Grinding and Sorting Particle Size on Phytochemical Yield in *Dipterocarpus alatus* Leaf Extract. *International Journal Of Biomaterials*, 2023, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2023/4512665>

69. Miao, L., Zhang, H., Yang, L., Chen, L., Xie, Y., & Xiao, J. (2022). Flavonoids. En Elsevier eBooks (pp. 353-374). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819096-8.00048-3>
70. Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P. B., Banadka, A., Sudheer, W. N., Nagella, P., Shehata, W. F., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A. S. (2023). Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. *Metabolites*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/METABO13060716>
71. Araújo, R. L., de Pinho, C. L. C., Farias, F. O., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2022). *Crinum L.* species as a potential source of alkaloids: Extraction methods and relevance for medicinal and pharmacological applications. *South African Journal of Botany*, 151, 720–734. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2022.10.053>
72. Espada-Domínguez, L., Ferrer-Serrano, A., Batista-King, Y., Bandera-Nápoles, A., & Almeida-Acosta, Y. (2016). Separación y clasificación de los alcaloides presentes en las hojas y flores de la especie *Spilanthes urens* Jacq. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212016000100006
73. Shamsa, F., Hamidreza, M., Ghamooshi, R., & Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J. Pharm. Sci.* 32. 17-20. <https://www.thaiscience.info/journals/Article/TJPS/10576423.pdf>
74. Sandeep, N., & Ghosh, S. (2020). Triterpenoids: Structural diversity, biosynthetic pathway, and bioactivity. En *Studies in natural products chemistry* (pp. 411-461). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819483-6.00012-6>
75. Garrido, G., Ortiz, M., & Pozo, P. (2013). Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. <http://jppres.com/jppres>
76. Iyer, M., Pal, K., & Upadhye, V. (2023). Phytochemicals and cancer. En Elsevier eBooks (pp. 295-308). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-19143-5.00007-4>
77. Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., & Yu, X. (2020). Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3). https://doi.org/10.1177/1934578X20903555/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1934578X20903555-FIG11.JPEG
78. Omari, N. E., Bakrim, S., Khalid, A., Abdalla, A. N., Iesa, M. A. M., Kadri, K. E., Tang, S. Y., Goh, B. H., & Bouyahya, A. (2024). Unveiling the molecular mechanisms: dietary phytosterols as guardians against cardiovascular diseases. *Natural Products And Bioprospecting*, 14(1). <https://doi.org/10.1007/s13659-024-00451-1>
79. Krzyzowska, M., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Bien, K., Orlowski, P., Celichowski, G., & Grobelny, J. (2017). Tannic acid modification of metal

nanoparticles: possibility for new antiviral applications. En Elsevier eBooks (pp. 335-363). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-47720-8.00013-4>

80. Cosme, F., Aires, A., Pinto, T., Oliveira, I., Vilela, A., & Gonçalves, B. (2025). A Comprehensive Review of Bioactive Tannins in Foods and Beverages: Functional Properties, Health Benefits, and Sensory Qualities. *Molecules*, 30(4), 800. <https://doi.org/10.3390/molecules30040800>
81. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal Of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
82. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584
83. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
84. Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Coumarins: A potential source of natural anticancer agents. *BioMed Research International*, 2013, <https://doi.org/10.1155/2013/963248>
85. Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry*, 12(8), 887–916.
86. Lake, B. G. (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 37(4), 423–453.
87. Gomes de Carvalho, N. K., Wellisson da Silva Mendes, J., & Martins da Costa, J. G. (2023). Quinones: Biosynthesis, Characterization of ¹³C Spectroscopical Data and Pharmacological Activities. *Chemistry & Biodiversity*, 20(12), e202301365. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202301365>
88. Marlene, C. C., Lengua, D., Ricardo, C., Ibarra, G., Jesús, C., & Olivero Verbel, T. (2013). Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides Database search on biological activity of quinoid molecules. *Revista Cubana de Información En Ciencias de La Salud*, 24(4), 416–430. <http://scielo.sld.cu>
89. Bitchagno, G. T. M., Sama Fonkeng, L., Kopa, T. K., Tala, M. F., Kamdem Wabo, H., Tume, C. B., Tane, P., & Kuiate, J. R. (2015). Antibacterial activity of ethanolic extract and compounds from fruits of *Tectona grandis* (Verbenaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12906-015-0790-5>

90. Ra, J. C. A. K. L. O., Spear, S. K., Huddleston, J. G., & Rogers, R. D. (2005). Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*, 7(2), 64. <https://doi.org/10.1039/b413546f>
91. Kamlet, M. J., Abboud, J. L., & Taft, R. W. (1977). The solvatochromic comparison method. 6. The .pi.* scale of solvent polarities. *Journal Of The American Chemical Society*, 99(18), 6027-6038. <https://doi.org/10.1021/ja00460a031>
92. Taft, R. W., & Kamlet, M. J. (1976). The solvatochromic comparison method. 2. The .alpha.-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities. *Journal Of The American Chemical Society*, 98(10), 2886-2894. <https://doi.org/10.1021/ja00426a036>
93. Kamlet, M. J., & Taft, R. W. (1976). The solvatochromic comparison method. I. The .beta.-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities. *Journal Of The American Chemical Society*, 98(2), 377-383. <https://doi.org/10.1021/ja00418a009>
94. Pu, M., Garrett M., E. (2023). *Cutibacterium acnes*. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/microcutibacteriumacne.html>
95. Foster, T. (1996). *Staphylococcus*. *Medical Microbiology - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>
96. Farha, A. K., Yang, Q., Kim, G., Li, H., Zhu, F., Liu, H., Gan, R., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>
97. An, L., Gong, N., Hu, T., Wang, L., Zhang, M., Huang, M., Chen, G., Tang, T., & Liu, X. (2023). Study on Antibacterial Activity and Mechanism of Improved Dian Dao San Against *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*). *Infection And Drug Resistance*, Volume 16, 4965-4975. <https://doi.org/10.2147/idr.s419161>
98. Koch, W., Zagórska, J., Michalak-Tomczyk, M., Karav, S., & Wawruszak, A. (2024). Plant Phenolics in the Prevention and Therapy of Acne: A Comprehensive Review. *Molecules*, 29(17), 4234. <https://doi.org/10.3390/molecules29174234>
99. Gaupp, R., Ledala, N., & Somerville, G. A. (2012). Staphylococcal response to oxidative stress. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00033>
100. Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. <https://encyclopedia.pub/entry/48879?utm>
101. Raj, J., Chaurasia O.P., Vajpayee P.K., Murugan M., & Bala, S. (2010). Antioxidative activity and Phytochemical investigation on a High Altitude Medicinal Plant *Dracocephalum heterophyllum* Benth. *PHCOGJ*. https://www.researchgate.net/publication/232041919_Antioxidative_activity_and_P

[hytochemical investigation on a High Altitude Medicinal Plant Dracocephalum heterophyllum Benth](#)

102. Rowe, R., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth Edition.
103. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (2003). FN/2003/EX/001, Agua Conservante. Formulario Nacional. https://www.aemps.gob.es/formulario-nacional/monografias/materias-primas/excipientes/fn_2003_ex_001.pdf
104. Sukanjanapong, S., Ploydaeng, M., & Wattanakrai, P. (2024). Skin Barrier Parameters in Acne Vulgaris versus Normal Controls: A Cross-Sectional Analytic Study. Clinical Cosmetic And Investigational Dermatology, Volume 17, 2427-2436. <https://doi.org/10.2147/ccid.s476004>
105. Vera-Navarro, L. (2022). Actualización en fotoprotección. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1652-67762022000100010

7. Anexos

1) Absorbancias CPT

[]	ABS Curva 1	ABS Curva 2	ABS Curva 2n		promedio	
20	0,182	0,199	0,121		0,167	
30	0,241	0,259	0,210		0,237	
40	0,375	0,419	0,351		0,382	
50	0,534	0,552	0,504		0,530	
60	0,674	0,701	0,649		0,675	
70	0,768	0,800	0,740		0,769	
R	0,9910			muestra 1	muestra 2	muestra 3
pendiente	0,0128		UA	0,498	0,528	0,471
interseccion	-0,1151		UA	0,498	0,528	0,471
			UA	0,498	0,528	0,471
			promedio	0,498	0,528	0,471
		ug EAG / mL		mg/mL		
	1	47,9781869	95956,37375	95,95637375		
	2	50,3259546	100651,9093	100,6519093		
	3	45,8651959	91730,39179	91,73039179		
	fd	2000				
				96,11289161	4,462817709	
				L3D		

[]	ABS Curva 1	ABS Curva 2	ABS Curva 2n		promedio	
20	0,182	0,199	0,121		0,167	
30	0,241	0,259	0,210		0,237	
40	0,375	0,419	0,351		0,382	
50	0,534	0,552	0,504		0,530	
60	0,674	0,701	0,649		0,675	
70	0,768	0,800	0,740		0,769	
R	0,9910			muestra 1	muestra 2	muestra 3
pendiente	0,0128		UA	0,456	0,499	0,444
interseccion	-0,1151		UA	0,456	0,499	0,444
			UA	0,456	0,499	0,444
			promedio	0,456	0,499	0,444
		ug EAG / mL		mg/mL		
	1	44,691312	89382,624	89,382624		
	2	48,0564458	96112,8916	96,1128916		
	3	43,7522049	87504,4098	87,5044098		
	fd	2000				
				90,9999752	4,52640676	
				L3M		

2) Absorbancias CFT

[]	ABS Curva 1	ABS Curva 2	ABS Curva 2n	promedio	
20	0,014	0,017	0,011	0,014	
40	0,033	0,028	0,020	0,027	
80	0,063	0,063	0,050	0,059	
100	0,075	0,082	0,059	0,072	
150	0,119	0,122	0,086	0,109	
180	0,141	0,143	0,097	0,127	
R	0,9989			muestra 1	muestra 2
pendiente	0,0007		UA	0,069	0,061
intersección	-0,0002		UA	0,069	0,061
			UA	0,069	0,061
			promedio	0,069	0,061
		ug EAG / mL		mg/mL	
	1	96,4717065	27590,9081	27,5909	
	2	85,3177203	24400,868	24,4009	
	3	71,3752376	20413,318	20,4133	
fd		286			
				24,135	3,59617
				L3D	

[]	ABS Curva 1	ABS Curva 2	ABS Curva 2n	promedio		
20	0,014	0,017	0,011		0,014	
40	0,033	0,028	0,020		0,027	
80	0,063	0,063	0,050		0,059	
100	0,075	0,082	0,059		0,072	
150	0,119	0,122	0,086		0,109	
180	0,141	0,143	0,097		0,127	
R	0,9989			muestra 1	muestra 2	muestra 3
pendiente	0,0007		UA	0,056	0,057	0,046
intersección	-0,0002		UA	0,056	0,057	0,046
			UA	0,056	0,057	0,046
			promedio	0,056	0,057	0,046
		ug EAG / mL		mg/mL		
	1	78,346479	22407,093	22,4071		
	2	79,7407273	22805,848	22,8058		
	3	64,4039963	18419,5429	18,4195		
	fd	286				
				21,2108	2,42553	
				L3M		

3) Absorbancias MIC

Bacteria y compuesto	1	2	3	4	5	6
S. aureus L3M	0,200766667	0,216133333	0,3059	0,414166667	0,5298	0,5924
S. aureus L3D	0,152333333	0,201166667	0,3354	0,397666667	0,3897	0,5112
S. aureus Tetraciclina	0,238066667	0,3086	0,490333333	0,485433333	0,2599	0,3767
S. epidermidis L3M	0,1576	0,1668	0,145133333	0,259733333	0,3247	0,352566667
S. epidermidis L3D	0,1573	0,192433333	0,2593	0,4167	0,508133333	0,5298
S. epidermidis Tetraciclina	0,5616	0,3068	0,401033333	0,330866667	0,3234	0,329366667
C. acnes L3M	0,131366667	0,148533333	0,3808	0,4453	0,640466667	0,755033333
C. acnes L3D	0,178066667	0,341366667	0,2732	0,722266667	0,7093	0,7223
C. acnes Tetraciclina	0,593	0,588466667	0,352866667	0,297633333	0,369933333	0,3898

7	8	9	10	11 (control positivo)	12 (control negativo)
0,6394	0,677	0,7082	0,71263333	0,658166667	0,043766667
0,555733333	0,5171	0,4866	0,58946667	0,6222	0,056033333
0,210833333	0,293366667	0,3056	0,2624	0,561833333	0,0436
0,400566667	0,411566667	0,42893333	0,44626667	0,417733333	0,0477
0,574933333	0,580933333	0,5669	0,58086667	0,574233333	0,050166667
0,331766667	0,285466667	0,2579	0,29976667	0,5575	0,0562
0,6849	0,651566667	0,6615	0,6059	0,706666667	0,041166667
0,7043	0,740066667	0,74956667	0,7066	0,6987	0,042033333
0,253666667	0,176433333	0,19886667	0,17286667	0,714	0,0431