



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola* (Ñachag) PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN PROTECTORES SOLARES”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: JOSÉ MIGUEL MIRANDA FREIRE

TUTOR: DRA. SUSANA DEL PILAR ABDO LÒPEZ

Riobamba- Ecuador

2019

©2019 José Miguel Miranda Freire

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho del autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: **EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola* (Ñachag) PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN PROTECTORES SOLARES**, de responsabilidad del señor José Miguel Miranda Freire, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Susana Del Pilar Ando López, M.Sc. _____

**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc. _____

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, José Miguel Miranda Freire soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

José Miguel Miranda Freire

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación realizado lo dedico a mis padres Narciza y Jorge, por su paciencia y dedicación puesta en mi para que pueda lograr tanto el desarrollo personal y académico. A mis hermanos y sobrino por darme su apoyo en esta etapa de mi formación profesional, a mi tutora Susana Abdo y mi asesor Diego Vinueza, así como también a todas las personas con las que pude compartir momentos inolvidables que quedaran en mi mente.

Miguel Miranda

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por guiar mi camino y permitirme disfrutar de este momento de mi vida que se traduce en felicidad.

A mi familia por apoyarme en cada decisión y meta que me he propuesto conseguir, también les agradezco por su apoyo no solo económico sino también moral que me ha permitido no decaer en momentos difíciles.

A mis amigos y amigas con los que compartí en los últimos semestres de la carrera, por todo el apoyo y momentos a menos que vivimos juntos.

A mi Tutora Susana Abdo y mi asesor Diego Vinueza, por compartir sus conocimientos, tiempo y esfuerzo en el proceso de realización de esta tesis.

Miguel Miranda

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 Radiación solar	4
1.2 Radiación UV.....	5
1.3 Clasificación de la radiación UV.....	5
1.4 Índice ultravioleta	6
1.5 Efectos de la radiación solar en la salud	6
<i>1.5.1 Alteraciones en la piel.....</i>	<i>6</i>
<i>1.5.2 Alteraciones en el sistema inmune</i>	<i>8</i>
<i>1.5.3 Alteraciones oculares</i>	<i>8</i>
1.6 La radiación solar en el país.....	9
1.7 El cáncer de piel en Ecuador.....	10
1.8 Fotoprotección.....	10
1.9 Filtros y sustancias con acción fotoprotectora.....	10
1.10 Estructura, clases y propiedad fotoprotectora de los flavonoides	11
1.11 <i>Bidens andicola</i>	13
<i>1.11.1 Clasificación científica.....</i>	<i>13</i>
<i>1.11.2 Descripción botánica.....</i>	<i>14</i>
<i>1.11.3 Usos terapéuticos.....</i>	<i>14</i>
<i>1.11.4 Composición química y actividad farmacológica.....</i>	<i>14</i>
1.12 <i>Passiflora quadrangularis</i>.....	16

<i>1.12.1 Clasificación científica</i>	16
<i>1.12.2 Descripción botánica</i>	17
<i>1.12.3 Usos terapéuticos</i>	17
<i>1.12.4 Composición química y actividad farmacológica</i>	17
1.13 Factor de protección solar (FPS)	19
1.14 Ensayos de irritabilidad ocular in vitro	20
<i>1.14.1 Prueba HET -CAM</i>	20
<i>1.14.2 Prueba HET-CAM TBS</i>	21
1.15 Estudio de genotoxicidad	22
<i>1.15.1 Prueba de micronúcleos</i>	22

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	24
2.1 Lugar de Recolección de la Muestra	24
2.2 Lugar de Investigación	24
2.3 Descripción botánica	24
2.4 Control de calidad de la droga vegetal	24
<i>2.4.1 Determinación del contenido de humedad</i>	25
<i>2.4.2 Determinación de cenizas totales</i>	25
<i>2.4.3 Determinación de cenizas solubles en agua</i>	26
<i>2.4.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	26
2.5 Tamizaje fitoquímico	27
2.6 Obtención y rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de Bidens andicola y de Passiflora quadrangularis	28
2.7 Valoración de fenoles totales	28
2.8 Determinación de flavonoides totales	29
2.9 Determinación del Factor de Protección Polar (FPS)	30
2.10 Ensayo de genotoxicidad en Vicia faba var. minor	31

2.11	Ensayo de irritación ocular por el método de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM)	32
2.12	Ensayo de irritación ocular por el método de la tinción con azul tripán de la membrana corioalantoidea (CAM-TBS)	33

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
3.1	Control de calidad de la droga vegetal	35
3.1.1	<i>Contenido de humedad</i>	35
3.1.2	<i>Contenido de cenizas totales</i>	36
3.1.3	<i>Contenido de cenizas solubles en agua</i>	36
3.1.4	<i>Contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	36
3.2	Tamizaje fitoquímico	36
3.3	Estandarización y Rendimiento de Extracción	39
3.4	Cuantificación de fenoles totales	39
3.5	Cuantificación de flavonoides totales	41
3.6	Factor de protección solar (FPS)	42
3.7	Ensayo de genotoxicidad en Vicia faba	43
3.8	Análisis Estadístico de los datos del ensayo de genotoxicidad	46
3.9	Ensayo de irritación ocular por el método de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM)	49
3.10	Ensayo de irritación ocular por el método de la tinción con azul tripán de la membrana corioalantoidea (CAM-TBS)	49
	CONCLUSIONES.....	52
	RECOMENDACIONES.....	53

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Descripción botánica de <i>Bidens andicola</i>	13
Tabla 2-1. Descripción botánica de <i>Passiflora quadrangularis</i>	16
Tabla 3-2. Pruebas a efectuar y metabolito secundario a identificar para el screening fitoquímico.	27
Tabla 4-3. Resultados del control de calidad de las drogas vegetales.....	35
Tabla 5-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de la porción aérea de <i>Bidens andicola</i>	36
Tabla 6-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de las hojas de <i>Passiflora quadrangularis</i>	37
Tabla 7-3. Resultado de la Estandarización y Rendimiento del extracto de <i>Bidens andicola</i> y <i>Passiflora quadrangularis</i>	39
Tabla 8-3. Absorbancias del estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones.	39
Tabla 9-3. Resultado de la cuantificación de fenoles totales de los extractos de <i>Bidens andicola</i> y <i>Passiflora quadrangularis</i>	40
Tabla 10-3. Absorbancias del estándar de quercetina a diferentes concentraciones.	41
Tabla 11-3. Resultado de la cuantificación de flavonoides totales de los extractos de <i>Bidens andicola</i> y <i>Passiflora quadrangularis</i>	42
Tabla 12-3. Resultados del FPS in vitro.....	42
Tabla 13-3. Tipo de fotoprotector según el FPS in vitro obtenido de los extractos de <i>Bidens andicola</i> y <i>Passiflora quadrangularis</i>	43
Tabla 14-3. Resultados de la prueba de micronúcleos.	43
Tabla 15-3. Factores inter-sujetos para el análisis de Micronúcleos (extractos de <i>B. andicola</i>)	46
Tabla 16-3. Test de Anova de un factor para el índice mitótico.....	46
Tabla 17-3. Prueba de Tukey para el análisis del índice mitótico	47
Tabla 18-3. Factores inter-sujetos para el análisis de IM	47
Tabla 19-3. Test de Anova de un factor para el índice mitótico.....	48
Tabla 20-3. Prueba de Tukey para el análisis del índice mitótico	48
Tabla 21-3. Resultado Prueba HET-CAM para <i>Bidens andicola</i> y <i>P. quadrangularis</i>	49
Tabla 22-3. Resultado Prueba CAM-TBS para <i>Bidens andicola</i> y <i>P. quadrangularis</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Espectro de la radiación solar.....	4
Figura 2-1. Índice ultravioleta.....	6
Figura 3-1. Tipos de cáncer de piel.....	7
Figura 4-1. Alteraciones oculares causadas por la radiación solar.	8
Figura 5-1. Índice UV a nivel global en septiembre del 2008.	9
Figura 6-1. Índice UV a nivel global a finales de enero del 2019.....	9
Figura 7-1. Estructura básica de los flavonoides.	11
Figura 8-1. Clases de flavonoides.....	12
Figura 9-1. Binde andicola.	13
Figura 10-1. Poliacetilenos aislados de varias especies de <i>Bidens</i>	15
Figura 11-1. Luteolina, flavonoide aislado de <i>Bidens</i>	15
Figura 12-1. <i>Passiflora quadrangularis</i>	16
Figura 13-1. Estructura química de algunas saponinas reportadas para <i>P. quadrangularis</i>	18
Figura 14-1. Estructura química de algunos flavonoides descritos para las hojas de <i>P. quadrangularis</i>	19
Figura 15-1. Clasificación de FPS COLIPA.....	19
Figura 16-1. Test de Draize.....	20
Figura 17-1. Esquema del ensayo HET-CAM.	21
Figura 18-2. Valores de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ utilizada para calcular el FPS.....	30
Figura 19-2. Relación de los puntajes con la categoría de irritación	33
Figura 20-2. Categorías del Potencial Irritante prueba CAM-TBS.....	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. Curva de calibración de ácido gálico.....	40
Gráfico 2-3. Curva de calibración de quercetina.....	41
Gráfico 3-3. FPS in vitro de los extractos hidroalcohólicos de <i>B. andicola</i> y <i>P. quadrangularis</i>	43
Gráfico 4-3. Índice mitótico a las 48 horas para los extractos de <i>Bidens andicola</i> y controles.	44
Gráfico 5-3. Índice mitótico a las 48 horas para los extractos de <i>Passiflora quadrangularis</i> y controles.....	45
Gráfico 6-3. Curva de calibración de colorante azul tripán.	50
Gráfico 7-3. Resultados del ensayo CAM-TBS.	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Evidencias fotográficas de la investigación

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FPS	Factor de protección solar
CAM TBS	Ensayo de Irritación de la Membrana Corioalantoidea con Azul de Tripán
COLIPA	Asociación Europea de Cosméticos y Perfumería
EXA	Agencia Espacial Civil Ecuatoriana
HET CAM	Ensayo de Irritación Ocular mediante la Membrana Corioalantoidea
IUV	Índice de Radiación Ultravioleta
IR	Infrarrojo
mL	Mililitros
Min	Minutos
nm	Nanómetros
Ppm	Partes por millón
μL	microlitros
MCA	Membrana corioalantoidea
MCN	Micronúcleos
IM	Índice mitótico
OMS	Organización Mundial de la Salud
RUV	Radiación ultravioleta

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de titulación fue determinar la actividad fotoprotectora y la seguridad, de los extractos hidroalcohólicos de *Bidens andicola* (Ñachag) y *Passiflora quadrangularis* (Badea). Se efectuó el control de calidad de la droga vegetal y el tamizaje fitoquímico con el que se evidenció la presencia de metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides. Se determinó el Factor de Protección Solar (FPS) mediante el método espectrofotométrico y aplicando la ecuación de Mansur, obteniendo un valor de FPS de 30 para el extracto de *Passiflora quadrangularis* y 32 para el extracto de *Bidens andicola*, preparados a una concentración de 2000ppm. El contenido de fenoles para *B. andicola* y *P. quadrangularis* fue de $137,40 \pm 0,08$ y $142,77 \pm 0,0$ mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de planta respectivamente, en cuanto al contenido de flavonoides se obtuvo $87,716 \pm 0,40$ y $13,98 \pm 0,2$ mg equivalentes de quercetina/g de planta respectivamente. Se evaluó la seguridad de los extractos mediante los ensayos de genotoxicidad utilizando como modelo las raíces de *Vicia faba var. minor* evidenciándose que ninguno de los extractos produce inhibición alguna de la mitosis ni la formación de micronúcleos, además de ello se determinó el grado de irritación ocular empleando las pruebas HET CAM y CAM-TBS en los cuales se obtuvo una clasificación de los extractos ensayados de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis*, como No Irritantes.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <TOXICOLOGÍA>, <ÑACHAG (*Bidens andicola*)> <BADEA (*Passiflora quadrangularis*)>, <GENOTOXICIDAD>, <IRRITACIÓN OCULAR>, <FOTOPROTECCIÓN>, <RADIACIÓN UV>.

SUMMARY

The objective of the present titling work was to determine the photoprotective activity and safety in the hydroalcoholic extracts of *Bidens andicola* (Ñachag) and *Passiflora quadrangularis* (Badea). The quality control of the plant drug and the phytochemical screening were carried out, this evidenced the presence of secondary metabolites such as phenols and flavonoids. The Sun Protection Factor (SPF) was determined by the spectrophotometric method and applying the Mansur equation, obtaining the FPS value of 30 for the *Passiflora quadrangularis* extract and 32 for the *Bidens andicola* extract, prepared at a concentration of 2000ppm. The content of phenols for *B. andicola* and *P. quadrangularis* was $137,40 \pm 0,08$ and $142,77 \pm 0,0$ mg equivalents of Gallic Acid/g of plant respectively, in the case of the content of flavonoids, it was obtained $87,716 \pm 0,40$ and $13,98 \pm 0,2$ mg equivalents of quercetin/g of plant respectively. The safety of the extracts was evaluated by genotoxicity tests using the roots of *Vicia faba var. minor* evidencing that none of the extracts produces any inhibition of mitosis or the formation of micronuclei, in addition to this the degree of hidden irritation was determined using the HET CAM and CAM-TBS tests in which a classification was obtained of the extracts tested of *Bidens andicola* and *Passiflora quadangularis*, as Non-Irritant.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <TOXICOLOGY>, <ÑACHAG (*Bidens andicola*)>, <BADEA (*Passiflora Quadrangularis*)>, <GENOTOXICITY>, <EYE IRRITATION>, <PHOTOPROTECTION>, <UV RADIATION>.

INTRODUCCIÓN

La luz proveniente del sol es importante para la vida, por ejemplo es necesaria para la síntesis de cutánea de vitamina D en los seres humanos, proceso por el cual se produce aproximadamente el 90% de requerimiento de esta vitamina (Reichrath & Nürnberg, 2008). Sin embargo, dichas radiaciones pueden ser muy peligrosas para la salud ya que su exposición excesiva es un factor que predispone a desarrollar afecciones en la piel como el cáncer de piel, enfermedades oculares como cataratas, afecciones al sistema inmunológico (WHO, 1999).

Históricamente, Unna y Dubreuilh reportaron por primera vez la relación existente entre la exposición a los rayos solares y el cáncer de piel no melanoma a finales del siglo XIX. Estos médicos reconocieron las queratosis actínicas (AK) y los carcinomas de células escamosas (SCC, por sus siglas en inglés) en áreas de la piel expuestas al sol con una frecuencia muy alta de los trabajadores de viñedos y marineros. Hoy en día, está científicamente aceptado que la exposición a los rayos solares representa el factor de riesgo ambiental más importante para el desarrollo de cáncer de piel no melanoma (Wang & Diepgen, 2006).

El índice ultravioleta es una herramienta importante desarrollada a través del trabajo del Proyecto INTERSUN de la OMS que nos proporciona una estimación de la exposición máxima a los rayos UV solares en la superficie de la Tierra. Se presenta como una aproximación de la cantidad de radiación ultravioleta (UV) que puede resultar nociva para la piel (WHO, 1999).

En el año 2008 la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA), publicó el informe Hiperión, en el cual da a conocer que el índice UV en las ciudades de Guayaquil y Quito llegaron hasta 14 y 24 respectivamente. Estos valores indican un riesgo extremo para la salud según los límites establecidos por la OMS que indica como un IUUV bajo un valor menor a 2 y extremadamente alto un valor mayor a 11. Una de las razones por la cual el país recibe una radiación solar superior a la tolerable para la salud es el debilitamiento de la capa de ozono en la franja ecuatorial (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008).

Las recomendaciones para la protección contra la radiación UV solar siguen siendo una parte fundamental de las campañas de salud pública y los programas de prevención destinados a reducir los daños en la piel y las enfermedades asociadas a ellas como el cáncer (Reichrath, 2006). Estas recomendaciones de protección solar incluyen el uso de protectores solares, ropa protectora y evitar la exposición a rayos UV artificiales y solares. La mayoría de los productos de protección solar combinan filtros solares químicos absorbentes de rayos UV y protectores solares inorgánicos físicos, que reflejan los rayos UV, para proporcionar una protección de amplio espectro. Hoy en

día, la mayoría de los productos de protección solar protegen contra las radiaciones UV-B y UV-A (Reichrath & Nürnberg , 2008).

El auge de productos naturales con uso cosmético es prometedor, es así que plantas como las del género *Bidens* presenta metabolitos que pueden ser empleados como fotoprotectores debido a su propiedad antioxidante y acción anti radiaciones UV tal es el caso de los poliacetilenos y los flavonoides como la luteolina (Dharmananda, s.f.). La familia de las *Passiflora* también presenta flavonoides tales como glucósidos de apigenina y luteolina principalmente, quercetol, apigenol, luteolol, vitexina, isovitexina, schaftosina, orientina, isorientina, camferol, quercetina, rutina, destacando la propiedad antioxidante de muchos de estos compuestos. En este sentido la utilización de plantas como *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis* representan un verdadero potencial para el desarrollo de fotoprotectores (Ingale & Hivrale, 2010).

En el desarrollo de productos para diversos usos resulta importante la realización de estudios interdisciplinarios los mismos que involucran el descubrimiento y aislamiento de compuestos químicos de origen vegetal. En esta etapa es fundamental evaluar el riesgo potencial que supondría estar expuesto a estos agentes presentes en esos productos, como el caso de los cosméticos. Algunos de esos estudios son los de irritación ocular, genotoxicidad, entre otros (García, 2003).

OBJETIVOS

GENERAL:

- Evaluar la seguridad *in vitro* de los extractos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola*, para su potencial aplicación en protectores solares.

ESPECÍFICOS:

- Determinar el factor de protección solar (FPS) de los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola*.
- Evaluar la posible genotoxicidad de los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola*.
- Conocer el grado de irritación ocular de los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola* a través de ensayos sobre la membrana corioalantoidea HET-CAM y CAM-TBS.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Radiación solar

La radiación solar es la energía emitida por el sol que se propaga por medio de ondas electromagnéticas. Esta energía se genera por proceso de fusión nuclear en el sol y se transmiten a la superficie terrestre (IDEAM, 2014). La radiación electromagnética del sol se distribuye en un rango de frecuencia las cuales son la radiación ultravioleta (UV) con una longitud de onda comprendida entre 100 hasta 400nm que representa el 9% de la energía recibida, la luz visible (400 a 760nm) que constituye el 47% de la radiación recibida, y los rangos cercanos al infrarrojo (760 a 1800nm) que representa el 45% (Sánchez, 2015), (ITE, s.f.).

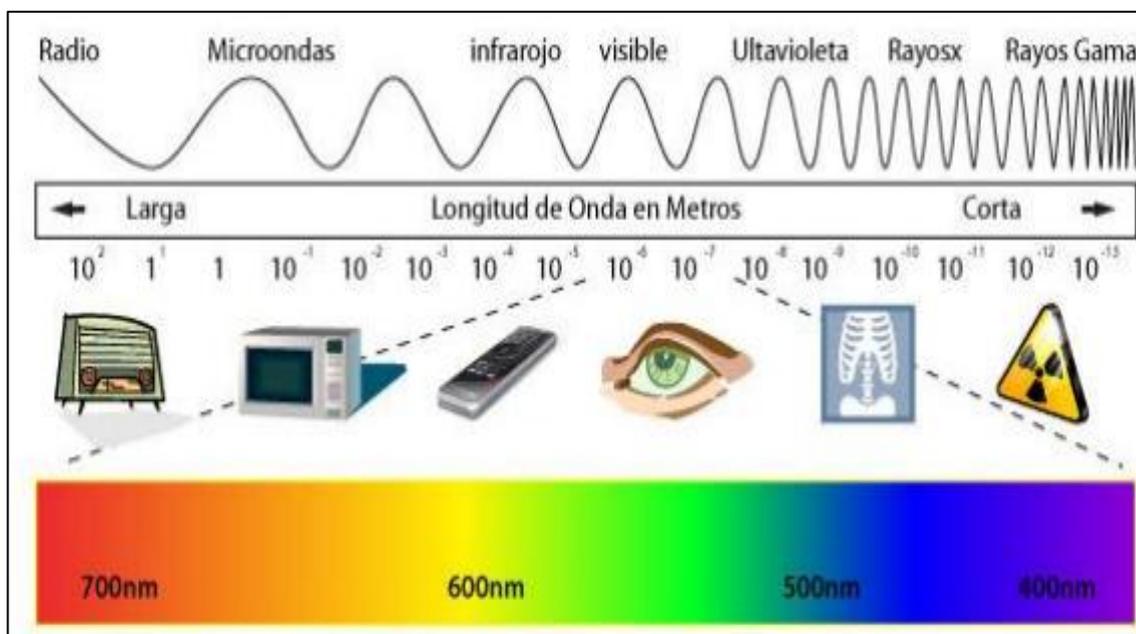


Figura 1-1. Espectro de la radiación solar.

Fuente: (Costa, et al., 2018)

1.2 Radiación UV

La radiación ultravioleta (RUV) es aquella que se encuentra en el espectro electromagnético entre los rayos X y la luz visible, que corresponde la longitud de onda de entre 40 y 400nm. La mayor fuente de esta radiación es el sol aunque existen fuentes artificiales como el caso de lámparas, cabinas de bronceado, etc (Zeman, s.f.).

La mayoría de la radiación ultravioleta del sol es absorbida por el oxígeno en la atmósfera terrestre la cual forma parte de la capa de ozono de la estratosfera inferior. La exposición continua a este tipo a la radiación ultravioleta del sol promueve a la aparición de efectos sobre la piel como el envejecimiento, arrugas, cambios en la pigmentación y cuando la exposición es muy frecuente, puede ser un factor de riesgo para padecer cáncer de piel en aquellas personas de piel clara (ARPANSA, s.f.) (OMS, et al., 2003).

Entre los beneficios positivos de la radiación UV está la estimulación de la producción de vitamina D en la piel, como agente terapéutico para la psoriasis por su propiedad bactericida a la longitud de onda de 260-280nm, también sirve como método de esterilización en el caso de fuentes artificiales (Gregersen, 2017).

1.3 Clasificación de la radiación UV

El espectro UV puede dividirse en:

Radiación UVA (320-400 nm): Es el tipo de radiación UV más común y la exposición a la misma genera un efecto de bronceado en un inicio, pero si la exposición tiene una frecuencia más alta, el efecto que se evidencia eritema (enrojecimiento de la piel). La capa de ozono absorbe muy poco este tipo de radiación. El papel positivo de que cumple la radiación UVA para la salud en parte es la síntesis de la vitamina D y los efectos negativos de la sobreexposición son la supresión del sistema inmune, endurecimiento de la piel, formación de cataratas (Zeman, s.f.).

Radiación UVB (290-320nm): La capa de ozono la absorbe casi en su totalidad sin embargo algunos rayos logran llegar a la superficie terrestre. El efecto negativo que produce esta radiación es a nivel del material genético (ADN) pudiendo provocar algunos tipos de cáncer de piel como el melanoma (Anon., 209).

Radiación UVC (220-290nm): Es de mayor energía en comparación con los otros dos tipos de radiación UV, pero no logra atravesar la atmósfera. No son una causa de efectos negativos como el cáncer de piel (Society, 2017).

1.4 Índice ultravioleta

La Organización Mundial de la Salud estableció el índice UV para dar a conocer la cantidad de radiación que llega a la superficie terrestre la cual puede afectar a la piel dependiendo del tiempo de exposición. Se trata de una escala que empieza en cero y no tiene un límite superior. Con esta información se pretende que las personas tomen las medidas necesarias de protección ante la exposición a la radiación UV (Strickland & Croager, 2013).

ÍNDICE UV	RIESGO	TME*	PROTECCIÓN SUGERIDA
0 a 2	BAJO	60+	
3 a 5	MODERADO	45	
6 a 7	ALTO	30	
8 a 10	MUY ALTO	25	
11 o +	EXTREMO	10	

*TME: Tiempo Máximo Recomendado de Exposición (expresado en minutos).

Figura 2-1. Índice ultravioleta

Fuente: (AIC, 2010).

1.5 Efectos de la radiación solar en la salud

La exposición excesiva a la radiación solar puede ser un factor de riesgo predisponente para el desarrollo de enfermedades como el cáncer de piel o alteraciones del sistema inmunológico, enfermedades oculares, entre otras. Actualmente esto es un tema de importancia para el sector de salud ya que hay varios factores relacionados con ello como el desgaste de la capa de ozono (Lim & Cooper, 2000).

1.5.1 Alteraciones en la piel

Los efectos causados por la radiación UV en la piel puede causar elastosis solar (engrosamiento y adelgazamiento desigual de la piel). Otro efecto que puede provocar es el adelgazamiento de

los vasos sanguíneos lo que se traduce en moretones. En cuanto a la pigmentación de la piel los cambios más comunes que producen son las pecas cuando los melanocitos han sido afectados por la radiación solar (Brannon, 2018).

El efecto más nocivo de la radiación sobre la piel es el cáncer. Los principales tipos de cáncer de piel son el melanoma, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas (Brannon, 2018).

Melanoma: Las células donde se produce este tipo de cáncer son los melanocitos encargado de la producción de melanina, sustancia importante para la protección frente a la radiación solar. También se lo conoce como melanoma maligno o melanoma cutáneo. Los melanomas se pueden originar en cualquier parte del cuerpo, pero comúnmente aparece en el tronco en el caso de los hombres y en las mujeres en las piernas. Otras regiones comunes para su aparición son el rostro y el cuello. Los melanomas suelen ser de color marrón o negro (ACS, 2016).

Carcinoma de células basales: Se produce en las células basales de la epidermis. El desarrollo de este tipo de cáncer es lento y rara vez migra a otras partes del cuerpo. En ocasiones algunos carcinomas basales resultan agresivos, esto cuando se deja que continúe desarrollándose hasta llegar a las capas más profundas de la piel e incluso en algunos puede alcanzar los huesos. Esto dificulta su tratamiento (MCS, s.f.).

Carcinoma de células escamosas: Se origina en las células de la capa externa de la piel. Es el segundo tipo de cáncer de piel más frecuente. Aparece en cualquier parte del cuerpo en especial aquellas que reciben directamente los rayos de la radiación UV (SCF, s.f.). Su crecimiento es lento. Si no se trata en una fase temprana, se propagan a otras regiones del cuerpo (MCS, s.f.).

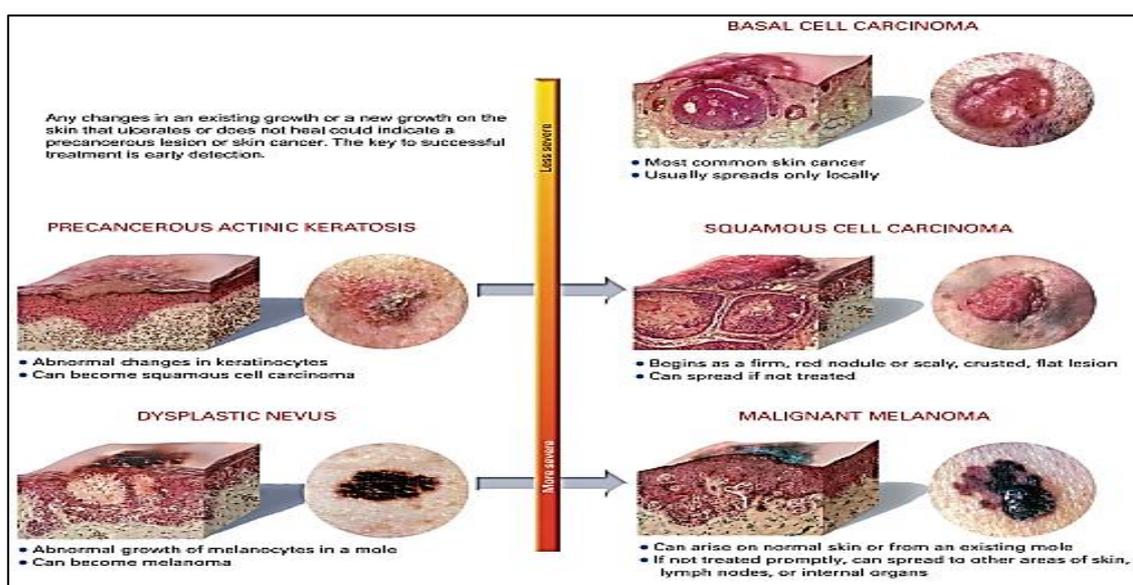


Figura 3-1. Tipos de cáncer de piel.

Fuente: (Randy & Gordon, 2009)

1.5.2 Alteraciones en el sistema inmune

La radiación UV puede alterar el sistema inmunológico UV modificando la actividad y distribución de las células que interviene en la respuesta inmune. Existen estudios que corroboran que la exposición a esta radiación en niveles ambientales, los cuales fueron llevados a cabo en ratones y humanos. La supresión del sistema inmune puede dejar al organismo susceptible de infecciones (WHO, 1999).

1.5.3 Alteraciones oculares

Las radiaciones UVA y UVB afectan a diferentes partes del ojo, así la primera es absorbida por la córnea y la segunda es absorbida por el cristalino pudiendo llegar más profundo en el ojo. La exposición reiterada a la radiación UV tiene efectos nocivos en los ojos, los cuales en gran parte son crónicos. Entre las alteraciones oculares se encuentra la queratitis (quemadura en la superficie del ojo), terigión (crecimiento anormal de tejido fibrovascular), cataratas (Nagle, 2012).



Figura 4-1. Alteraciones oculares causadas por la radiación solar.

Fuente: (Vicente, 2011)

1.6 La radiación solar en el país

La Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA) en el 2008 publica el informe Hiperión, con el cual indicaron que la capa de ozono presentaba un debilitamiento sobre la franja ecuatorial del planeta. En este sentido se comprobó que la radiación UV en nuestro país sobrepasa aquellos límites considerados como tolerables para los seres humanos, según lo que indica el índice UV establecido por la OMS (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008).

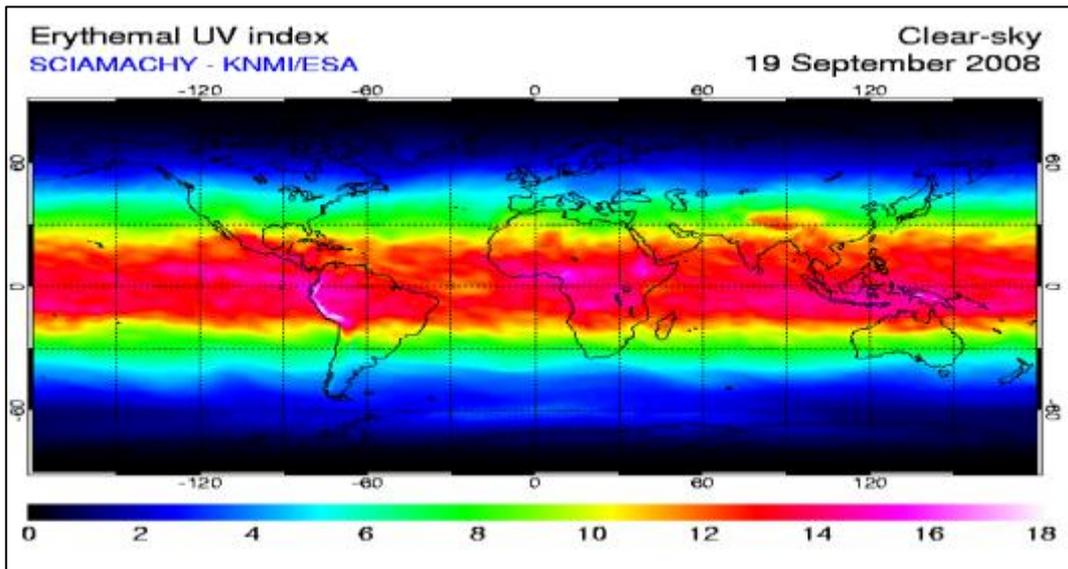


Figura 5-1. Índice UV a nivel global en septiembre del 2008.

Fuente: (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008)

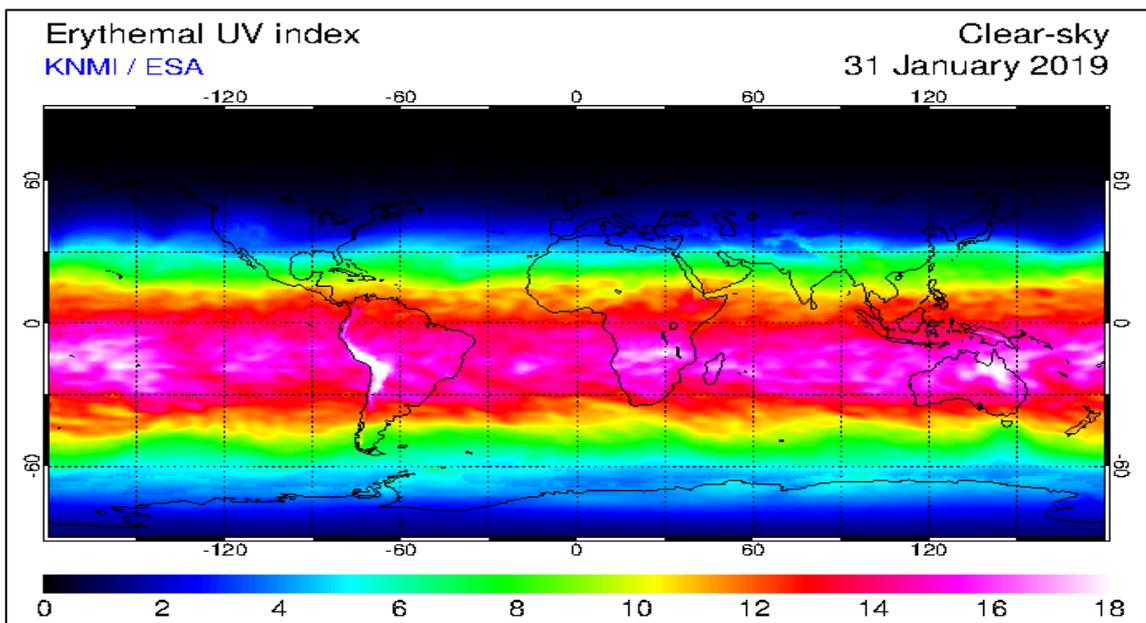


Figura 6-1. Índice UV a nivel global a finales de enero del 2019.

Fuente: (TEMIS, 2019)

Como se muestra en la Figura 5-1 el índice UV en nuestro país a finales del mes de enero de 2019 sobre pasa los límites del índice UV considerados como tolerables incluso se evidencia una diferencia importante con lo observado en el 2008 corroborando el deterioro que sufre la capa de ozono (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008).

1.7 El cáncer de piel en Ecuador

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los casos de cáncer de piel han aumentado significativamente a nivel mundial. En nuestro país se ha observado que los grupos más afectados por esta patología son los hombres en edades comprendidas entre los 60 y 64 años con un registro de casos de 125 por cada 100.000 personas y en las mujeres es de 113. El número de casos aumenta con la edad (Navarrete, 2018).

1.8 Fotoprotección

La fotoprotección se define como la protección contra los efectos perjudiciales en especial de las radiaciones UV; más concretamente se trata del fenómeno por el cual ante la exposición solar la materia viva se puede proteger del daño por la posterior radiación ultravioleta (Ros-Usó, s.f.) .

1.9 Filtros y sustancias con acción fotoprotectora

Filtros químicos

Los filtros químicos contienen compuestos orgánicos, y actúan creando una reacción química que convierte los rayos UV en calor y después liberándolo de la piel. Estos pueden absorber la mayoría de las radiaciones UVA. Algunos ejemplos son oxibenzona, octinoxato, octocrileno y homosalato, PABA (ácido p-amino benzoico), Estos deben aplicarse cada dos horas porque estos tienden a erosionar más rápido en comparación con los filtros físicos. (Rouleau, 2018).

Filtros físicos

Los filtros de este tipo son moléculas inorgánicas que actúan protegiendo la piel de la radiación solar reflejando y dispersando los rayos UV. Los filtros físicos pueden proteger contra la radiación UVA y UVB y su acción es inmediata. Las partículas como el dióxido de titanio (TiO_2) u óxido de zinc (ZnO) funcionan como filtros UV físicos (Saewan & Jimtaisong , 2003).

1.10 Estructura, clases y propiedad fotoprotectora de los flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de especies vegetales. Estos compuestos poseen propiedades antioxidantes y quelantes. Hay más de 4000 variedades de flavonoides identificados varios de ellos son responsables de la coloración que presentan las frutas, flores y hojas de muchas especies vegetales. Los efectos protectores de los flavonoides en los sistemas biológicos se deben a su propiedad captar radicales libres y por capacidad quelante de metales. En cuanto a la protección contra la radiación UV en las plantas, los flavonoides eliminan las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Saewan & Jimtaisong , 2003).

Estructura básica de los flavonoides

La estructura básica de los flavonoides es un esqueleto de difenilpirano, compuesto de dos anillos (A y B) unidos por una cadena de tres carbonos que forma un anillo pirano cerrado (anillo heterocíclico que contiene oxígeno, el anillo C). La configuración de su estructura sería C6-C3-C6 (Tazzini, 2014).

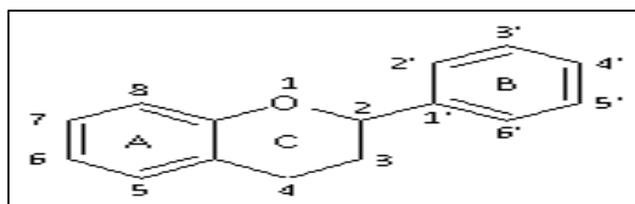


Figura 7-1. Estructura básica de los flavonoides.

Fuente: (Tazzini, 2014)

Clases de flavonoides

Los flavonoides se dividen en seis subclases (flavonas, flavonoles, flavononoles, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas) en función de la conexión del anillo B con el anillo C, así como el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C (Nichols & Katiyar , 2010).

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo -OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

Figura 8-1. Clases de flavonoides

Fuente: (Escamilla, et al., 2009).

Propiedad fotoprotectora de los fenoles

La mayoría de los flavonoides naturales son pigmentos, típicamente amarillos, rojos o morados, y pueden absorber la radiación UV. Por lo tanto, cuando se aplican tópicamente, pueden evitar la penetración de la radiación en la piel. La radiación que pueden absorber los flavonoides incluye todo el espectro UVB de longitudes de onda y parte de los espectros UVC y UVA. Así los flavonoides pueden actuar como un filtro solar. La capacidad de estos compuestos naturales para actuar como filtros solares puede reducir la inflamación, el estrés oxidativo y los efectos dañinos del ADN de la radiación UV en la piel y, por lo tanto, en la aplicación tópica, los efectos fotoprotectores de los flavonoides se deben en parte a este efecto de protección solar (Nichols & Katiyar , 2010).

La capacidad antioxidante de los flavonoides se debe a su grado de hidroxilación ya que esta propiedad importante está relacionada con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3'

y 4' del anillo B. Estos le proveen una gran estabilidad al radical formado, por otro lado mientras los grupos hidroxilos presentes en las posiciones 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 siendo donadores de electrones y neutralizadores de los radicales libres (Ren, et al., 2010).

La quercetina y la luteolina que son flavonoides orto di-hidroxisustituidos tienen la capacidad de captar radicales libres en comparación con sus homólogos mono hidroxisustituidos. En este sentido se puede decir que los flavonoides ejercen una doble protección frente a la radiación ultravioleta actuando como captador de radicales libres y como filtros solares (Mejía, et al., 2014).

1.11 *Bidens andicola*



Figura 9-1. *Bidens andicola*.

Fuente: Miranda, 2018.

1.11.1 Clasificación científica

Tabla 1-1: Descripción botánica de *Bidens andicola*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asteroideae
Familia:	Asteraceae

Subfamilia:	Asteroideae
Género:	<i>Bidens</i>
Especie:	<i>andicola</i>

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Fuente: (Escobar , 2015).

1.11.2 Descripción botánica

Se le conoce popularmente como Ñachag, se trata de una planta perenne de aproximadamente 20-30cm de altura. Las hojas son simples y opuestas con un margen dentado. Las flores se encuentran dispuestas en cimas terminales con pétalos de color amarillo. su tallo es delgado y ramificado. Se halla en toda la serranía ecuatoriana. Se la encuentra en cualquier época del año y florece en los meses de octubre a julio (Sari, 2014).

1.11.3 Usos terapéuticos

Tradicionalmente se usa para tratar la insolación, fiebre, diarrea, prostatitis, infección de las vías urinarias, cálculos, renales, cistitis acné, ictericia. Actúa como tranquilizante en desordenes nerviosos. También se lo uso como colorante, tónico, antigripal (Ordóñez, 2006).

1.11.4 Composición química y actividad farmacológica

Uno de los compuestos químicos presentes en el Ñachag (*Bidens andicola*) son los poliacetilenos que son hidrocarburos que absorben fuertemente la luz UV de onda larga; Su actividad medicinal se ve alterada ante la exposición a la luz por el contrario en la oscuridad su efecto disminuye. Esta fotoactivación hace que las plantas del género *Bidens* sean una interesante opción para la aplicación tópica, porque al exponerse al sol provocará su activación. En las hojas se encuentra

el fenilheptatriina (PHT) que es un poliacetileno con actividad antibacteriana y antiviral, posee un alto nivel de seguridad porque no provoca modificaciones en el ADN (Dharmananda, s.f.).

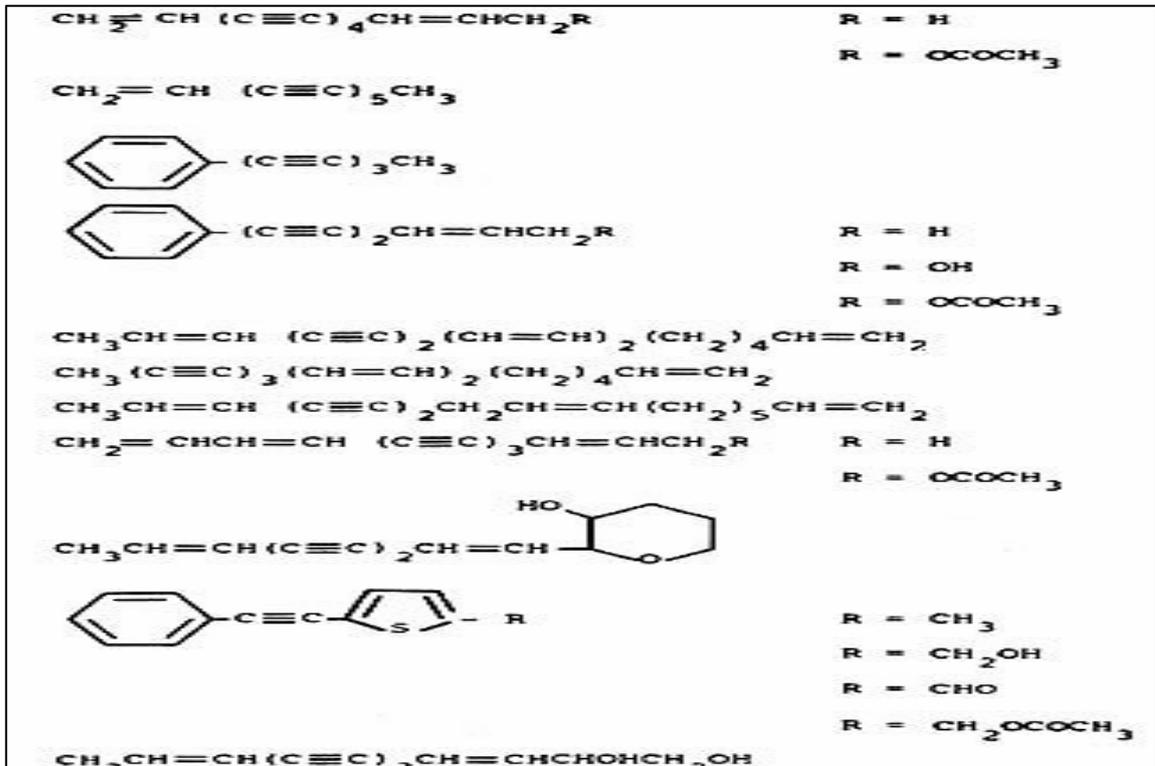


Figura 10-1. Poliacetilenos aislados de varias especies de *Bidens*.

Fuente: (Dharmananda, s.f.)

Otro de los compuestos de interés farmacológico de *Bidens* son los flavonoides, aunque no se han dilucidado completamente, se han encontrado los siguientes: luteolina que es un grupo de flavonoles que tienen quercetina como su aglicona; y un grupo de glicósidos de calchona. La quercetina es un flavonoide vegetal cuyo derivado el 3-O-metil-éter presenta potentes acciones medicinales como antiinflamatorio (Dharmananda, s.f.).

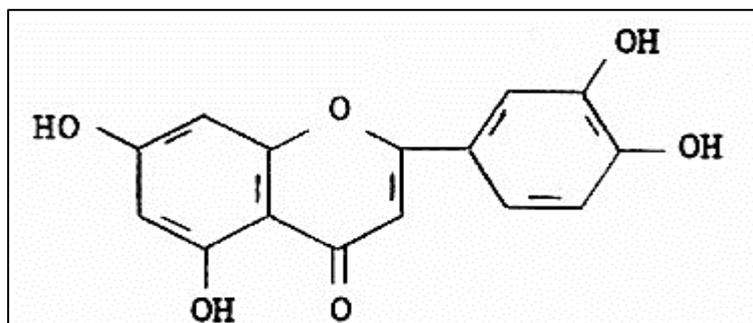


Figura 11-1. Luteolina, flavonoide aislado de *Bidens*.

Fuente: (Dharmananda, s.f.)

1.12 *Passiflora quadrangularis*



Figura 12-1. *Passiflora quadrangularis*

Fuente: (Palli, s.f.).

1.12.1 Clasificación científica

Tabla 2-1: Descripción botánica de *Passiflora quadrangularis*.

Reino:	Plantae
División:	Angiosperma
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Violales
Familia:	Passifloraceae
Género:	<i>Passiflora</i>
Especie:	<i>quadrangularis</i>

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Fuente: (Escobar, 2015).

1.12.2 Descripción botánica

Popularmente se le conoce como badea y se trata de una planta trepadora que puede extenderse hasta los 15m de largo, presenta tallos con zarcillos simples. Las hojas son ovaladas, cordadas en la base, lanceoladas, con dimensiones de 10 a 25 cm de largo y 7 a 15 cm de ancho. Las flores presentan 8 a 12 cm de diámetro y los pétalos son de color blanco, violáceo, rosado por el lado externo y rojo por el lado interno. Presenta un fruto grande de 10 a 30 cm de largo, 8 a 16 cm de diámetro. Crece a nivel del mar hasta los 1000 msnm (Pozo, 2013).

1.12.3 Usos terapéuticos

La pulpa se utiliza como sedante para aliviar el dolor de cabeza nervioso, asma, diarrea, disentería, insomnio. Las semillas contienen un compuesto cardiotónico que presenta un efecto sedante. La decocción de las hojas se utiliza como antihelmíntico y se utiliza para baños en afecciones de la piel. Las cataplasmas de las hojas se usan para tratar dolencias hepáticas. La raíz se emplea como emético, diurético y vermífugo. En polvo y mezclada con aceite, se aplica como cataplasma calmante, sedante o analgésico (tropical.theferns, 2015).

1.12.4 Composición química y actividad farmacológica

Entre los compuestos identificados en las hojas de *Passiflora quadrangularis* están las saponinas, las cuales se tratan de triterpenos glicosidados con un núcleo cicloartano, el más representativo es el quadrangulósido, también se han identificado otras saponinas como la 22-hidroxi-iso-quadrangulósido 9,19-ciclolanost-21,24-epoxi-en-3 β 25,26-triol-3 β -O-gentiobiosido (Orsini, et al., 1987).

Los flavonoides son otro grupo de compuestos presentes en las hojas de *P. quadrangularis*, en especial de tipo C-glucósidos. Los que se han identificado son la vitexina-2''-O-glucósido, vitexina-2''-O-xilósido el cual se encuentra en mayor proporción, orientina-2''-O-glucósido, orientina-2''-O-xilósido y vitexina (Sakalem, et al., 2011).

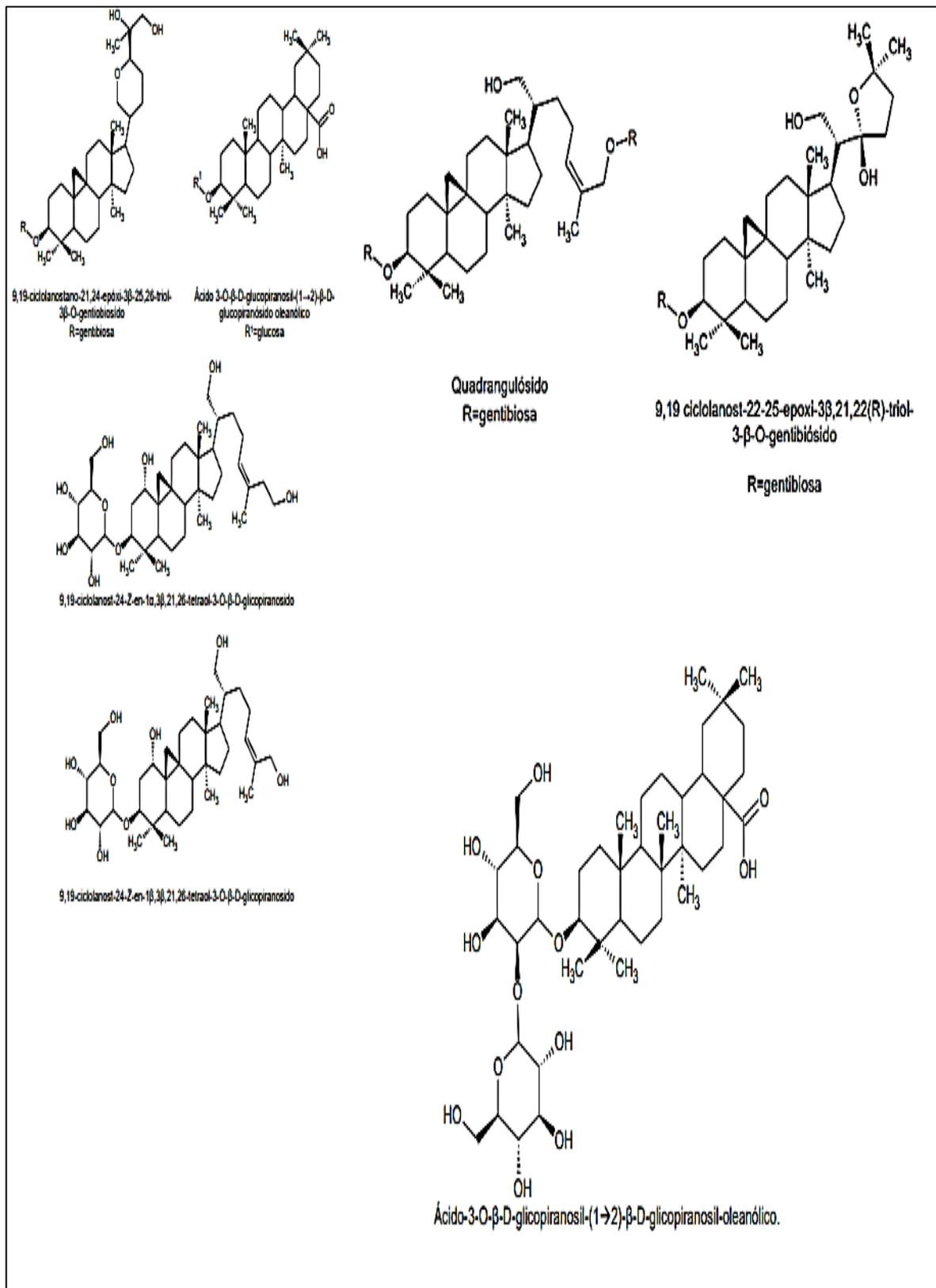


Figura 13-1. Estructura química de algunas saponinas reportadas para *P. quadrangularis*.

Fuente: (Echeverry, 2017)

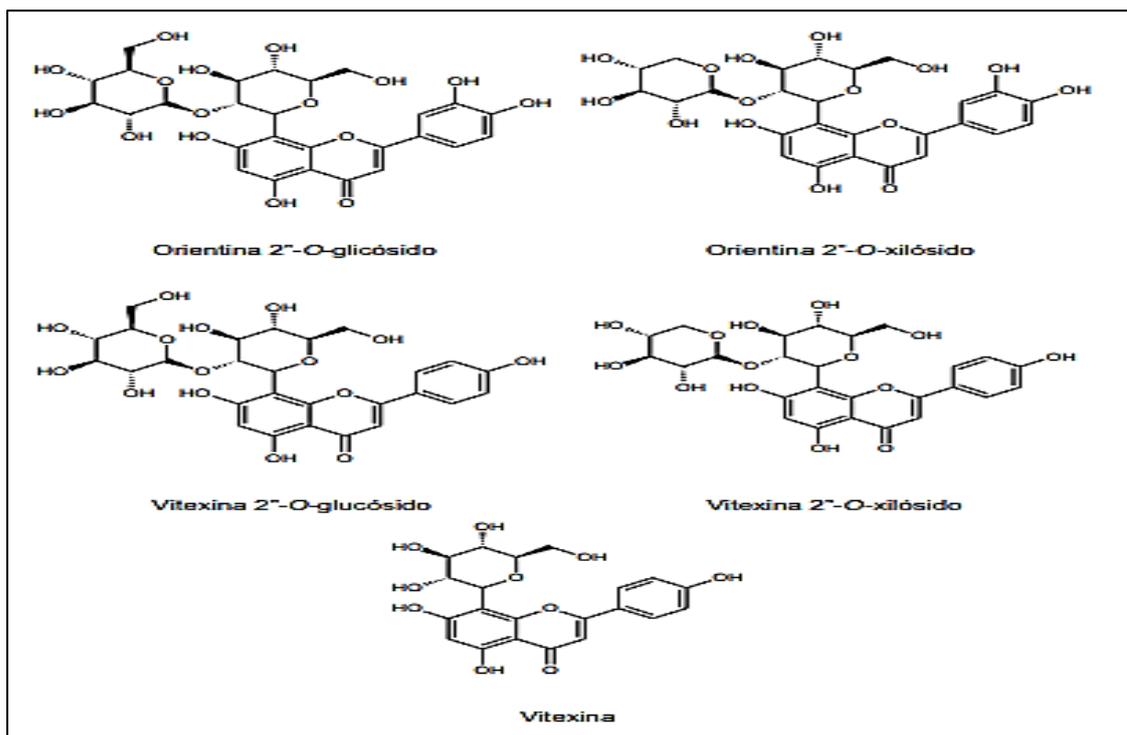


Figura 14-1. Estructura química de algunos flavonoides descritos para las hojas de *P. quadrangularis*.

Fuente: (Echeverry, 2017)

1.13 Factor de protección solar (FPS)

El factor de protección solar (SPF) es el valor más importante para determinar cuantitativamente la efectividad de un protector solar, siendo aceptado universalmente. El método se basa en la determinación de la dosis eritematosa mínima (DME), definida como la cantidad más pequeña de energía requerida para desencadenar el eritema, en áreas de piel protegida y no protegida. El valor SPF luego se calcula como la relación entre el DME de la piel protegida y no protegida (Schalka & Silva, 2010).

TIPO	FPS
Bajo	2 - 4 - 6
Medio	8 - 10 - 12
Alto	15 - 20 - 25
Muy Alto	30 - 40 - 50
Ultra	50+

Figura 15-1. Clasificación de FPS COLIPA.

Fuente: (Stengel, 2006)

1.14 Ensayos de irritabilidad ocular *in vitro*

En el pasado, las pruebas de sustancias que causaban irritabilidad se realizaban comúnmente aplicando la sustancia directamente sobre la córnea de los conejos conocida como prueba de Draize, con el propósito de evaluar cosméticos, medicamentos entre otras sustancias y productos. Por cuestiones científicas y éticas se han buscado alternativas para esta prueba. (BRADLAW & WILCOX, 1997).

Ejemplos de métodos alternativos al test de Draize son el HET-CAM (Hen's Egg Chorioallantoic membrane test) que es cualitativo y el método CAM-TBS (Chorioallantoic membrane-Trypan blue system) cuantitativo, los dos se basan en el uso de la membrana corioalantoidea para probar la capacidad de irritación ocular de una sustancia en particular (Espinoza & Del Rosario, 2015).

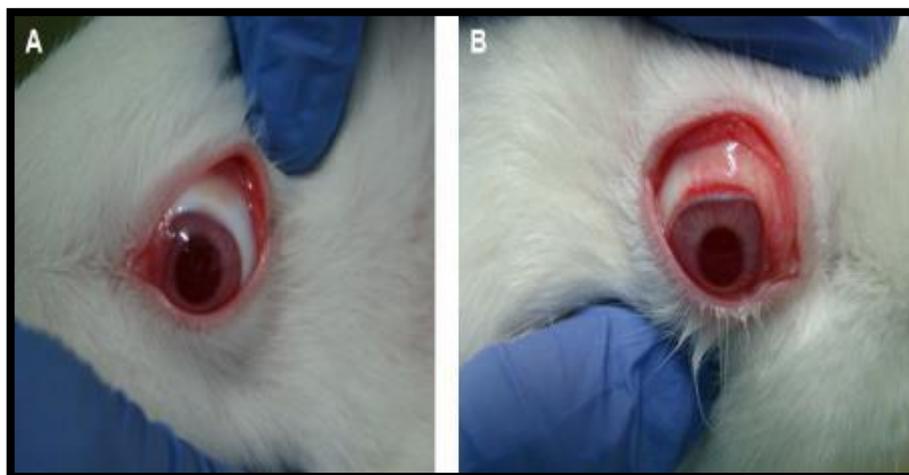


Figura 16-1. Test de Draize.

Fuente: (Vasconcelos, et al., 2015).

1.14.1 Prueba HET -CAM

Fundamento de la prueba HET-CAM

Los huevos de gallina fértiles se colocan en una incubadora con condiciones de temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $65 \pm 7\%$, durante 9 días y revisando si los huevos tienen algún defecto para luego proceder a retirarlos de la incubadora y así no afecte a los demás. La cascara alrededor de la cámara de aire se retira y las membranas internas se extraen dejando al descubierto la membrana corioalantoidea (MCA). Las sustancias a ensayar se aplican directamente sobre la MCA y se dejan en contacto por 5 minutos. (Spielmann & Liebsch, 2004).

La posible irritación de los compuestos puede detectarse observando los cambios adversos que ocurren en la membrana corioalantoidea del huevo después de la exposición a las sustancias de prueba (Taha & Abdennour, 2017).

Los efectos se miden por el inicio de hemorragia; coagulación; y lisis de los vasos sanguíneos. Estas evaluaciones se toman en cuenta individualmente y luego se combinan con el propósito de obtener un puntaje el cual se utiliza para clasificar el nivel de irritación de la sustancia de prueba (ICCVAM, 2010).

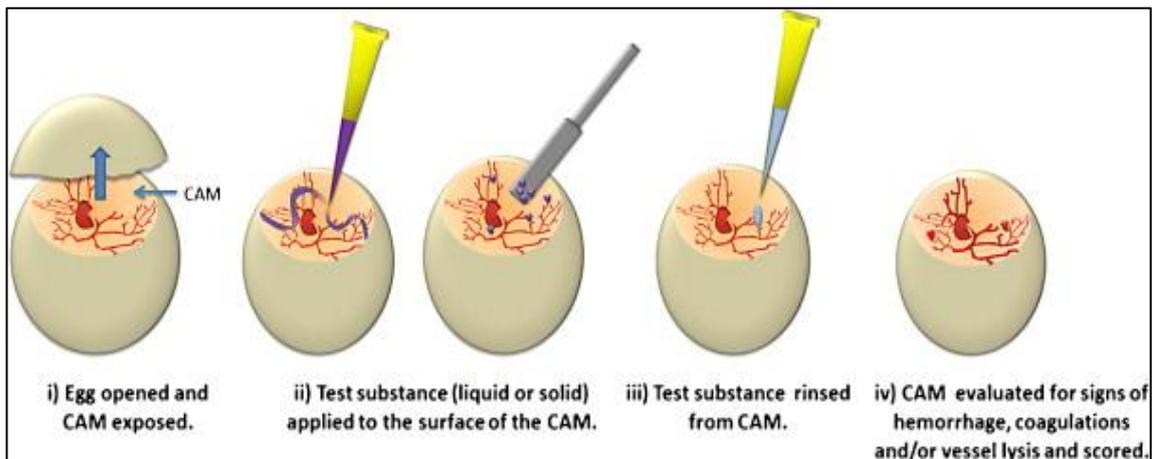


Figura 17-1. Esquema del ensayo HET-CAM.

Fuente: (Wilson, et al., 2015).

Las ventajas de este método radican en su sencillez, bajo costo y rapidez, sin embargo una de sus desventajas es la evaluación subjetiva que se tiene con el mismo (Espinoza & Del Rosario, 2015).

1.14.2 Prueba HET-CAM TBS

Con el método CAM-TBS permite evaluar de manera cuantitativa el daño que sufre la membrana corioalantoidea tras la aplicación de la sustancia de prueba. En este ensayo se emplea un colorante llamado azul tripán, para efectuar por consiguiente una determinación espectrofotométrica para evaluar el daño en el tejido de la MCA. Con este método se logra tener un resultado más objetivo acerca de la irritación ocular, a diferencia del HET-CAM. de irritación que la obtenida con el método HET-CAM, que se basa en una estimación subjetiva de la lisis, hemorragia y coagulación, (INVITOX, 1996).

Fundamento: El fundamento de este método es la absorción del colorante azul tripán por parte de las células muertas de la MCA, esto por la unión con las proteínas citosólicas dentro de esas

células. De este modo la cantidad del colorante adsorbido se correlaciona con la cantidad de células muertas en la MCA. (Itagaki, et al., 1995)

El CAM-TBS se lo emplea para la evaluación de cremas, líquidos no diluidos, soluciones acuosas. También se suele emplear para muestras solubles en agua, insolubles o poco solubles. Una de las mejores ventajas que presenta el método es la capacidad de usar las mismas concentraciones de las sustancias a evaluar, como en el caso de los ensayos *in vivo*, de tal manera que se pueda comparar los resultados de los ensayos *in vitro* con los *in vivo* (INVITOX, 1996).

1.15 Estudio de genotoxicidad

Un estudio de genotoxicidad está diseñado para detectar compuestos que provocan alteraciones genéticas de forma directa o indirecta en las células que están expuestas a los sustratos tóxicos. Los estudios de genotoxicidad se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*. (EUPATI, 2015).

1.15.1 Prueba de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos se emplea para la determinación de daño genotóxico generado por ciertos agentes químicos y físicos. Esta indica los daños que se presentan en los cromosomas debido a los agentes mutagénicos, a través de la observación de fragmentos acéntricos lo que se conoce como evento clastogénico o cromosomas rezagados que se trata de un evento aneugénico (Cedano , et al., 2012).

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que de manera espontánea o debido a agentes genotóxicos se quedan ubicados fuera del núcleo (Cedano , et al., 2012).

Esta prueba se puede llevar a cabo en células animales o vegetales. En el caso de células vegetales se suele usar como bioindicador las semillas de *Vicia faba*, que presenta un genoma $2n = 12$, que se conforma de un par de cromosomas metacéntricos con satélites y cinco pares de cromosomas acrocéntricos, la selección de este modelo se debe a su característica de alterarse en presencia de alguna sustancia que produzca algún evento de genotoxicidad (Beltrán & Gonza, 2017).

Con la prueba de micronúcleos se puede detectar agentes clastogénicos y aneuploidogénicos. Los clastogénicos inhiben la síntesis del ADN y debilita los enlaces entre las bases dando como resultado una fractura en los cromosomas y los aneuploidogénicos interfieren con la

polimerización de los microtúbulos en el proceso de formación del uso mitótico lo que se traduce en la no incorporación en las celu.as hijas es decir quedan rezagados (Hatanaka , et al., 1992).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Recolección de la Muestra

La recolección de la muestra de *Bidens andicola* tuvo lugar en la parroquia de Quimiag localizada en el cantón Riobamba y la obtención de *Passiflora quadrangularis* se realizó en el cantón Cumandá, ambos cantones pertenecientes a la provincia de Chimborazo.

2.2 Lugar de Investigación

La investigación experimental se llevó a cabo en el Laboratorio del Productos Naturales de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.3 Descripción botánica

Posterior a la recolección de las muestras vegetales se realizó la identificación botánica de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis* en el herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.4 Control de calidad de la droga vegetal

Previo a la realización del control de calidad vegetal se realizó un acondicionamiento previo que consistió en seleccionar, limpiar y secar (a la temperatura de 40°C) las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *Bidens andicola* y del mismo modo para las hojas de *Passiflora quadrangularis*.

2.4.1 Determinación del contenido de humedad

Para efecto de ello se empleó el método gravimétrico el cual se basa en la desecación de la muestra, posteriormente midiendo la pérdida de su masa (Miranda & Cuellar, 2000).

Con los datos los datos obtenidos se proceden al cálculo del contenido de humedad mediante la siguiente formula:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M_c} * 100$$

Donde:

%H= porcentaje de humedad.

M₂= masa de la cápsula con la muestra expresada en gramos.

M₁= masa de la cápsula con la muestra desecada expresada en gramos.

M= masa de la cápsula vacía.

2.4.2 Determinación de cenizas totales

El método que se empleó para esta determinación fue el indicado por (Miranda & Cuellar, 2000).

Para el cálculo de este parámetro se emplea la siguiente formula:

$$\%Ca = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

$$\%CT = \frac{Ca}{100 - H} * 100$$

Donde:

%Ca= porcentaje de cenizas en base hidratada.

M= masa de la cápsula vacía.

M₁= masa de la cápsula con la muestra sin incinerar.

M₂= masa de la cápsula con la muestra incinerada.

%CT= porcentaje de cenizas totales.

H= contenido de humedad.

2.4.3 Determinación de cenizas solubles en agua

Para la realización de este ensayo se empleó el método gravimétrico expuesto por (Miranda & Cuellar, 2000).

La fórmula para el respectivo cálculo es la siguiente:

$$\%Ca = \frac{M_2 - M_4}{M_1 - M} * 100$$

$$\%CT = \frac{Ca}{100 - H} * 100$$

Donde:

%Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M = masa de la cápsula vacía

M₁ = masa de la cápsula con la muestra sin incinerar.

M₂ = masa de la cápsula con la muestra incinerada.

M₄ = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua.

%CT = porcentaje de cenizas solubles en agua.

H = contenido de humedad (Miranda & Cuellar, 2000).

2.4.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Para la determinación de este parámetro se empleó el método gravimétrico descrito por (Miranda & Cuellar, 2000).

Para el cálculo respectivo se empleó la siguiente formula:

$$\%Ca = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

$$\%CT = \frac{Ca}{100 - H} * 100$$

Donde:

%Ca = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa de la cápsula vacía

M₁ = masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de incineración.

M₂ = masa de la cápsula con la muestra incinerada.

%CT= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base anhidra.

H = contenido de humedad (Miranda & Cuellar, 2000).

2.5 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screenig fitoquímico se realizó según el método descrito por (Miranda & Cuellar, 2000) el cual involucró un conjunto de ensayos los cuales permitieron determinar de manera cualitativa los metabolitos secundarios presentes en la porción aérea de *Bidens andicola* y en las hojas de *Passiflora quadrangularis*. Los extractos en los cuales se aplicó las diferentes pruebas fueron el etéreo, etanólico y acuoso en los cuales se observó mediante reacciones de color o precipitación la presencia o ausencia de los grupos químicos presentes en las drogas vegetales (UNID, 2016).

Tabla 3-2. Pruebas a efectuar y metabolito secundario a identificar para el screening fitoquímico.

Extracto etéreo
Ensayos
Ensayo de Dragendorff y Mayer – Alcaloides
Ensayo de Baljet - Cumarinas
Ensayo de Sudán III - Ácidos grasos
Extracto etanólico
Ensayos
Ensayo de Liebermann- Burchard - Triterpenos y/o esteroides
Ensayo de Espuma - Saponinas
Ensayo de Dragendorff y Mayer – Alcaloides
Ensayo de Baljet - Cumarinas
Ensayo de Fehling - Azúcares reductores
Ensayo de Borntrager – Quinonas
Ensayo de Shinoda – Flavonoides
Ensayo de antocianidinas
Extracto acuoso
Ensayos

Ensayo de Espuma – saponinas
Ensayo de Fehling - carbohidratos reductores
Ensayo de Shinoda - flavonoides
Ensayo de Dragendorff y Mayer - alcaloides
Ensayo de mucílagos

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Fuente: (Rondón Arias, et al., 2010).

2.6 Obtención y rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de *Bidens andicola* y de *Passiflora quadrangularis*

Para la obtención de los extractos se pesó 100g de cada una de las drogas vegetales secas y trituradas previamente y se le añadió a cada una un volumen de etanol al 70% en una proporción 1:10, dejando macerar en frascos de color ámbar bien sellados durante 72 horas con la ayuda de un agitador orbital. Luego de este proceso se realizó el filtrado los extractos para ser concentrados en un rotavapor con una temperatura constante de 40°C y con rotación de 60rpm (Miño, 2007).

Luego de obtener el extracto seco se determinó el rendimiento de la extracción:

$$\%RE = \frac{PS}{PL} * 100$$

Donde:

%RE= porcentaje del rendimiento de extracción.

Ps= peso del balón con el extracto seco.

P0= peso del balón con el extracto líquido.

2.7 Valoración de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu que se fundamenta en la capacidad de los compuestos fenólicos de reaccionar en presencia de compuestos oxidantes. Básicamente se trata de una reacción de óxido-reducción (Cruzado, et al., 2013).

Al oxidarse los polifenoles de la muestra, se observa la aparición de una coloración azulada debido a la reducción del reactivo de Folin (inicialmente de color amarillo), siendo posible la cuantificación por medio de espectrofotometría a 765nm (García, et al., s.f.).

Se elaboró una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico de 20 a 100ppm con intervalos de 20ppm.

Luego de obtener la curva de calibración de ácido gálico se procedió a preparar soluciones de 200ppm en etanol al 70% a partir de los extractos secos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis* y se realizó el mismo procedimiento que se llevó a cabo con el estándar (García, et al., s.f.).

El ensayo se realizó por triplicado tomando un volumen de 250 μ L, luego se trasvasó a balones de aforo de 25mL, se agregó 15mL de agua destilada y 1,25mL del reactivo de Folin, seguido se realizó la homogenización con la ayuda de un agitador Vortex por 30 segundos para luego dejar reposar durante 8 minutos. Luego se adicionó 3,75mg de Na₂CO₃ al 7,5%, se aforó y homogenizó 5 veces y se guardó en oscuridad por un lapso de 2 horas. Finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765nm (Huang & Ng, 2012).

La cantidad de fenoles totales se expresó como equivalente gramo de ácido gálico (mg EGAE/g de extracto seco) por gramo de extracto en base a la curva de calibración que se obtuvo. Esto se realiza despejando la concentración de la ecuación de la recta y el resultado obtenido multiplicado por el factor de dilución (García, et al., s.f.).

2.8 Determinación de flavonoides totales

Para determinar el contenido de flavonoides se elaboró una curva de calibración con un estándar de quercetina en concentraciones de 20 hasta 100ppm (Huang & Ng, 2012).

Una vez obtenida la curva de calibración se preparó por triplicado soluciones de 200ppm con los extractos secos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis* y se procedió de la siguiente manera.

- Se tomó 1mL de cada una de las soluciones y se colocó en tubos de ensayo rotulados.
- A cada tubo se le agregó 4mL de agua destilada y 0,3mL de NaNO₂ al 5%, se agitaron los tubos y se dejó en reposo (durante 5minutos) protegiéndolos de la luz y a temperatura ambiente.
- Después se adicionó 0,3mL de cloruro de aluminio al 10% y se agitó con un Vortex por 1minuto y se dejó reposar en oscuridad por 5 minutos.
- Se añadió 2mL de NaOH 1M y se agitó en Vortex por 15segundos observándose un complejo de color rosado.

- Se almacenó en la oscuridad durante 15 minutos y luego se procedió a leer las muestras en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 510nm.
- El resultado se expresó como miligramos equivalentes de quercetina por miligramo de extracto seco (mgEQ/extracto seco), obteniendo este valor al reemplazar el valor de la absorbancia y el resultado multiplicado por el factor de dilución.

2.9 Determinación del Factor de Protección Polar (FPS)

Para la determinación del Factor de Protección Solar se empleó el método de (Mansur , et al., 1986) para lo cual se realizaron diluciones en etanol a partir de una solución madre a partir de los extractos secos de *B. andicola* y *P. quadrangularis*, para de este modo obtener muestras de diferentes concentraciones (20, 200, 500, 1000ppm).

Luego se midió las absorbancias de las muestras mediante espectrofotometría a longitudes de onda comprendidas entre 290 a 320nm que corresponden al rango del UVB. Con los valores obtenidos se calculó el FPS mediante la siguiente formula (Mansur , et al., 1986):

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Donde:

FPS= Factor de Protección Solar.

FC= Factor de corrección equivalente a 10

EE (λ) = Espectro del efecto eritemogénico.

I (λ) = Intensidad del sol en la longitud de onda λ.

Abs (λ)= Absorbancia de la solución.

Longitud de onda (nm)	290	295	300	305	310	315	320	TOTAL
EE (λ) x I (λ)	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0839	0,0180	1,000

Figura 18-2. Valores de EE (λ) x I (λ) utilizada para calcular el FPS

Fuente: (Sayre , et al., 1980).

2.10 Ensayo de genotoxicidad en *Vicia faba var. minor*

El ensayo se efectuó por triplicado y se comenzó escogiendo semillas de *Vicia faba*, posteriormente se lavaron y se sumergieron en un recipiente con agua destilada durante 24 horas, después se retiró la cáscara y se dejó germinar por 3 días colocándolas en medio de dos capas de algodón humedecidas (Sánchez Alarcón, et al., 2017).

Una vez que las raíces alcanzaron un diámetro de 2 a 3cm se procedió a exponerlas a los extractos de *B. andicola* y *P. quadrangularis* preparados a diferentes concentraciones (500, 1000, 2000, 4000 y 10000ppm), así como también a los controles positivo y negativo (Etanol y agua destilada), durante 24 y 48 horas y a temperatura ambiente (Beltrán & Gonza, 2017).

Después de haber transcurrido los periodos de exposición se sumergieron las raíces en agua destilada para su recuperación durante 48 horas a temperatura ambiente. Luego de ese tiempo se cortaron las raíces con un bisturí y se introdujeron en la solución de Farmer (75mL de etanol + 25mL de ácido acético glacial) y seguido de ello se almacenó a una temperatura de 4°C durante 24 horas. Luego se lavaron las raíces con agua destilada y se realizó la hidrólisis empleando HCl 1N durante 10 minutos a una temperatura de entre 55 a 60°C mediante baño de agua hirviendo (Delgado, et al., 2010).

Posteriormente se volvió a lavar las raíces y se colocaron en etanol al 70% durante 30min. a 4°C. Luego de un lavado para eliminar el exceso de etanol, las raíces fueron colocadas en ácido acético al 45% durante 20 minutos a temperatura ambiente (Delgado, et al., 2010).

Para la tinción se sumergieron las raíces en el colorante (orceína acética al 1%). Se calentó en baño de agua hirviendo hasta la emisión de vapores sin que llegue a hervir y luego dejando enfriar, este proceso se repitió de 2 a 3 veces durante 15 minutos (Urteaga & Lallana, 2005).

Finalmente, se realizó el corte de las raíces sobre un portaobjetos, primero 1mm desde la punta hacia arriba que corresponde a porción meristemática y luego 1mm sobre esta para obtener la región F1. El aplastado o squash se realizó con un cubreobjetos para favorecer a la dispersión de las células y se selló las placas con esmalte de uñas. La observación se realizó en el microscopio contando mil células (Beltrán & Gonza, 2017).

Cuando el porcentaje del índice mitótico (IM) es menor en relación con los obtenidos con el control negativo, indica la presencia de alteraciones en el proceso de crecimiento y desarrollo celular de las células expuestas a las sustancias de prueba. De otra manera si el porcentaje de IM se encuentra por encima de los valores del control negativo, se traduce en una proliferación celular que puede resultar dañina (Valencia , et al., 2013).

Para el cálculo de índice mitótico y de micronúcleos se emplearon las siguientes formulas:

$$\text{ÍNDICE MITÓTICO(IM)TOTAL} = \frac{\text{NÚMERO DE CÉLULAS EN CADA FASE}}{1000} * 100$$

$$\text{MICRONÚCLEOS (MCN)} = \frac{\text{NÚMERO DE CÉLULAS DE INTERFASE CON MCN}}{1000} * 100$$

2.11 Ensayo de irritación ocular por el método de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM)

El ensayo se inició seleccionando huevos frescos fértiles (no mayores a 2 días). Estos se colocaron en una incubadora con condiciones de temperatura de $37,50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $62.5 \pm 7.5\%$ durante 9 días. La rotación de los huevos se realizó de manera automática cada 2 horas (Laignier Cazedey, et al., 2009) (ICCVAM, 2010).

En el octavo día se revisa la vialidad de los huevos observando con luz artificial la presencia de venas de tamaño regular (Taype Espinoza, 2015).

Para el noveno día los huevos son removidos de la incubadora para efectuar el ensayo, se identificó la cámara de aire y se procedió a retirar la cascara de esa zona. Luego se humedeció la membrana interna con solución salina y se la removió con unas pinzas procurando no dañar la membrana interna (ICCVAM, 2010).

Posteriormente se aplicaron 0,3mL sobre la membrana corioalantoidea (MCA), de las sustancias de prueba las cuales fueron preparadas previamente a partir de los extractos de *B. andicola* de *B. andicola* y *P. quadrangularis* en concentraciones de 250, 500 y 2000 ppm, así se cómo también los controles negativos (NaCl al 0,9%) y positivo (NaOH 0,1N). Se utilizaron tres huevos para cada muestra. (Taha & Abdennour, 2017).

Luego se observó por 5 minutos y se anotó el tiempo en que se evidencia cada una de las reacciones que se producen en la MCA, que son los siguientes:

- **Hemorragia:** sangrado de los vasos.
- **Lisis vascular:** desintegración de vasos sanguíneos.
- **Coagulación:** desnaturalización de proteínas intra y extravasculares (ICCVAM, 2010).

El puntaje de irritación se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\left(\left(\frac{(301 - \text{Hemorrhage Time})}{300} \right) \times 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Lysis Time})}{300} \right) \times 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Coagulation Time})}{300} \right) \times 9 \right)$$

Dónde:

Tiempo de hemorragia = tiempo (en segundos) de la primera aparición de hemorragias en la sangre.

Tiempo de lisis = tiempo (en segundos) de la primera aparición de lisis del vaso sanguíneo.

Tiempo de coagulación = tiempo (en segundos) de la primera aparición de coagulación de proteínas.

La relación entre puntajes y categoría de irritación se indican a continuación:

Scores on HET-CAM	Category of irritation
0 – 0.9	Nonirritant or practically no irritation
1 – 4.9	Weak or slight irritation
5 – 8.9 or 5 – 9.9	Moderate irritation
9 – 21 or 10 - 21	Strong or severe irritation

Table adapted from CAMVA, 2008.

Figura 19-2. Relación de los puntajes con la categoría de irritación

Fuente: (Laignier Cazedey, et al., 2009)

2.12 Ensayo de irritación ocular por el método de la tinción con azul tripán de la membrana corioalantoidea (CAM-TBS)

El método que se utilizó es el descrito en el estudio realizado por (Lagarto, et al., 2006) (Camones, et al., 2013) y según (INVITOX, 1996) procediendo de la siguiente manera:

Las muestras a ensayar fueron los extractos hidroalcohólicos de *B. andicola* y *P. quadrangularis* en concentraciones de 250, 500 y 2000ppm y los controles positivo y negativo. Se emplearon 3 huevos por cada muestra (Camones, et al., 2013).

El proceso para la incubación hasta dejar al descubierto la MCA es el mismo que se efectúa para el HET CAM. Posteriormente se procedió a aplicar 300µL de cada una de las muestras sobre una zona de la MCA delimitada por un anillo de silicona, durante 20 segundos para cada caso (Reis Mansur, et al., 2016).

Se lavó la MCA con agua destilada y se pipeteó 500 µL de una solución al 1 % del colorante Azul de Tripán y se dejó actuar por 60 segundos, en la zona delimitada por el anillo de silicona (INVITOX, 1996).

Luego se lavó el exceso de colorante con agua destilada por otros 20 segundos. Se continuó, con la ayuda de unas tijeras, a cortar la MCA (el área rodeada por el anillo de silicona) y colocarla en un tubo de ensayo con 5 mL de Formamida, se agitó y centrifugó a 1500 rpm. Al sobrenadante obtenido se le midió la absorbancia a 595 nm, al igual que al control negativo el cual es una membrana no tratada y cuyo valor de absorbancia es restado de el de las tratadas (Lagarto, et al., 2006).

Se construyó una curva de calibración para lo cual se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm de las siguientes concentraciones del colorante azul tripán en Formamida: 10⁶M, 10⁵M y 5x10⁵M. Esto sirve para los respectivos cálculos (Lagarto, et al., 2006)

De acuerdo con Reis Mansur el puntaje para cada formulación se obtiene empleando la siguiente formula:

$$CA : d \times \frac{5}{1000} \times 10^9 \text{ nmol}$$

Donde:

CA = Cantidad de colorante absorbido.

d = concentración de colorante/mg de membrana

Cada formulación se clasificará en base a las puntuaciones de HET-CAM:

CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO	CATEGORÍA
≤ 0,100 nmoles/mg	NO IRRITANTE
0,100 – 0,150 nmoles/mg	IRRITANTE MODERADO
≥0,150 nmoles/mg	IRRITANTE SEVERO

Figura 20-2. Categorías del Potencial Irritante prueba CAM-TBS.

Fuente: (Argyropoulus, et al., 2007).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de la droga vegetal

Tabla 4-3. Resultados del control de calidad de las drogas vegetales

Ensayo	Resultados de <i>Passiflora quadrangularis</i> (%)	Resultados de <i>Bidens andicola</i> (%)	Límites según la USP 35
Contenido de humedad	8,15 ± 0,04	7,885 ± 0,309	14%
Contenido de cenizas totales	7,80 ± 0,07	6,078 ± 0,371	12%
Contenido de cenizas solubles en agua	4,35 ± 0,18	3,747 ± 0,163	7%
Contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	3,60 ± 0,33	2,944 ± 0,331	5%

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

3.1.1 Contenido de humedad

Como se muestra en la Tabla 4-3, el contenido de humedad resultante en el caso de *P. quadrangularis* fue de 8,15% y para *B. andicola* fue de 7,885%, valores que no sobrepasan los límites indicados por la USP 35. En este sentido se evidenció que el proceso de secado y almacenamiento se llevó a cabo correctamente favoreciendo a que no se activen los procesos enzimáticos que puedan provocar el deterioro del material vegetal así como también el ataque de microorganismos tales como bacterias y hongos (Mukherjee, 2008).

3.1.2 Contenido de cenizas totales

Los valores del contenido de cenizas totales para *P. quadrangularis* y para *B. andicola* fue de 7,80% y de 6,078%, lo que indica la ausencia de algún tipo de alteración, adulteración o contaminación en las drogas vegetales utilizadas debido a que se encuentran dentro del límite de referencia como se muestra en la Tabla 4-3 (Guillen & Sarmiento, 2011).

3.1.3 Contenido de cenizas solubles en agua

Este parámetro permite conocer si la materia vegetal presenta sales minerales, por lo que, con los resultados obtenidos de este ensayo se puede evidenciar que la porción aérea de *Bidens andicola* con un valor de 3,747% y las hojas de *P. quadrangularis* con un valor de 4,35% no presentan cantidades considerables de tales componentes dado que no exceden el límite del 7% (Tabla 4-3).

3.1.4 Contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Los valores de este parámetro fueron para *Bidens andicola* de 2,944% y para *P. quadrangularis* 3,60% (Tabla 4-3) siendo un indicativo de la baja presencia de sílica que suele provenir de agentes como la arena o tierra.

3.2 Tamizaje fitoquímico

Con el tamizaje fitoquímico se pudo identificar los metabolitos secundarios de interés presentes en la porción aérea de *Bidens andicola* y en las hojas de *P. quadrangularis*, mediante reacciones de coloración y precipitación utilizando los extractos etéreos, etanólico y acuoso de estas plantas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 5-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de la porción aérea de *Bidens andicola*

ENSAYO	TIPO DE METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Aceite y grasa	(+)	NA	N/A
Dragendorff	Alcaloides	(-)	(-)	(+)

Mayer	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Wagner	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Balget	Lactonas- Cumarinas	(++)	(+)	N/A
Lieberman- Buchard	Triterpenos- Esteroides	(-)	(-)	NA
Catequinas	Catequinas	NA	(+)	NA
Resinas	Resinas	NA	(-)	NA
Fehling	Azúcares Reductores	NA	(+)	(+)
Espuma	Saponinas	NA	(+)	(+)
Cloruro férrico	Compuestos Fenólicos	NA	(+++)	(+++)
Borntrager	Quinonas	NA	(+++)	NA
Shinoda	Flavonoides	NA	(+++)	(+++)
Antocianidinas	Antocianidinas	NA	(++)	NA
Mucílagos		NA	NA	(+)
Nihidrina		NA	(-)	N/A
(+++) Abundante, (++) Moderado, (+) Escaso, (-) No existe, NA (No Aplica)				

Realizado por: Miguel Miranda, 2019

Tabla 6-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Passiflora quadrangularis*

ENSAYO	TIPO DE METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Aceite y grasa	(+++)	NA	N/A
Dragendorff	Alcaloides	(-)	(+)	(+)
Mayer	Alcaloides	(-)	(+)	(+)
Wagner	Alcaloides	(-)	(+)	(+)
Balget	Lactonas- Cumarinas	(-)	(++)	N/A
Lieberman- Buchard	Triterpenos- Esteroides	(+++)	(+++)	NA
Catequinas	Catequinas	NA	(-)	NA
Resinas	Resinas	NA	(-)	NA
Fehling	Azúcares Reductores	NA	(-)	(-)
Espuma	Saponinas	NA	(+++)	(+++)
Cloruro férrico	Compuestos Fenólicos	NA	(++)	(+++)
Borntrager	Quinonas	NA	(-)	NA

Shinoda	Flavonoides	NA	(++)	(+++)
Antocianidinas	Antocianidinas	NA	(++)	NA
Mucílagos		NA	NA	(-)
Nihidrina		NA	(-)	NA
(+++)				
(++)				
(+) Escaso, (-) No existe, NA (No Aplica)				

Realizado por: Miguel Miranda, 2019

Los resultados del tamizaje fitoquímico (Tabla 5-3) para *Bidens andicola* indicaron la presencia escasa de compuestos grasos según el ensayo de Sudán. En cuanto a lactonas y cumarinas en el extracto etéreo se identificó una presencia moderada de las mismas mientras que en el extracto alcohólico fue escasa.

En el caso del extracto alcohólico se observó una escasa presencia de catequinas y saponinas que fueron corroborados con los ensayos de catequina y espuma respectivamente. En cuanto a los fenoles, la presencia de estos se verificó con el ensayo de cloruro férrico en el cual se observó una coloración verde oscura, gran cantidad de estos tanto en el extracto alcohólico como acuoso. Del mismo modo se evidenció gran cantidad de flavonoides en los extractos acuoso y alcohólico según el ensayo de Shinoda. Otros metabolitos identificados en el extracto alcohólico fueron en manera escasa catequinas y en gran cantidad quinonas (Tabla 5-3).

Los resultados obtenidos de los ensayos del tamizaje fitoquímico al comparar con otros obtenidos por (Hernández, 2018) y (Vinueza, et al., 2017), se corrobora que *Bidens andicola* presenta compuestos fenólicos, flavonoides, catequinas, los mismos en los que se centra el interés debido a las propiedades fotoprotectoras asociada a su acción antioxidante (Dharmananda, s.f.).

Para el caso de screening fitoquímico de *Passiflora quadrangularis* (Tabla 6-3) se verificó la presencia de metabolitos como aceites y grasa los cuales se encontraron en gran cantidad en extracto etéreo. La presencia de alcaloides fue escasa a través de los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner, en el extracto alcohólico y acuoso.

En el extracto etéreo y alcohólico se observó la presencia de triterpenos-esteroides en abundancia. También se verificó la presencia de saponinas en el extracto acuoso y alcohólico mediante el ensayo de espuma. En cuanto a los fenoles y flavonoides se observó una gran cantidad en los extractos acuoso y alcohólico. Otro compuesto que se observó son las antocianidinas en el extracto alcohólico (Tabla 6-3).

Comparando los resultados obtenidos con los reportados por (Anon., 2016), las hojas de *Passiflora quadrangularis* presentan metabolitos secundarios como fenoles, flavonoide, saponinas, aceite, grasas, etc. Los mismos que cuentan con propiedades de interés farmacológico como el caso de los flavonoides para su aplicación en fotoprotectores (Malca & Matara, 2018).

3.3 Estandarización y Rendimiento de Extracción

Tabla 7-3. Resultado de la Estandarización y Rendimiento del extracto de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis*.

ENSAYO	RESULTADO Extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>	RESULTADO Extracto etanólico de <i>Passiflora quadrangularis</i>
Rendimiento de extracción	21,90%	23,11%
Color	Amarillo-Marrón	Verde-marrón
Olor	Herbal	Herbal

Realizado por: Miguel Miranda, 2019

Como se muestra en la tabla 7-3 el porcentaje de rendimiento de extracción de los extractos etanólicos de *B. andicola* y *P. quadrangularis* fue de 21,9% y 23,1% respectivamente. El extracto seco de *Bidens andicola* exhibió una coloración amarillo marrón debido a los flavonoides y demás pigmentos presentes en la porción aérea de esta planta y acompañado de un olor herbal. En el caso del extracto seco de *Passiflora quadrangularis* se evidenció un color verde-marrón y un aroma herbal.

3.4 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales de los extractos etanólicos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis* se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Con la ecuación de la recta $y = 0,0008x + 0,013$ y con $r = 0,9992$, obtenida del estándar de ácido gálico, se procedió a calcular la cantidad de fenoles totales despejando la concentración y el resultado obtenido multiplicado por el factor de dilución.

Tabla 8-3. Absorbancias del estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones.

Concentración en ppm	Absorbancias
20	0,029
40	0,046
60	0,060
80	0,077
100	0,093

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

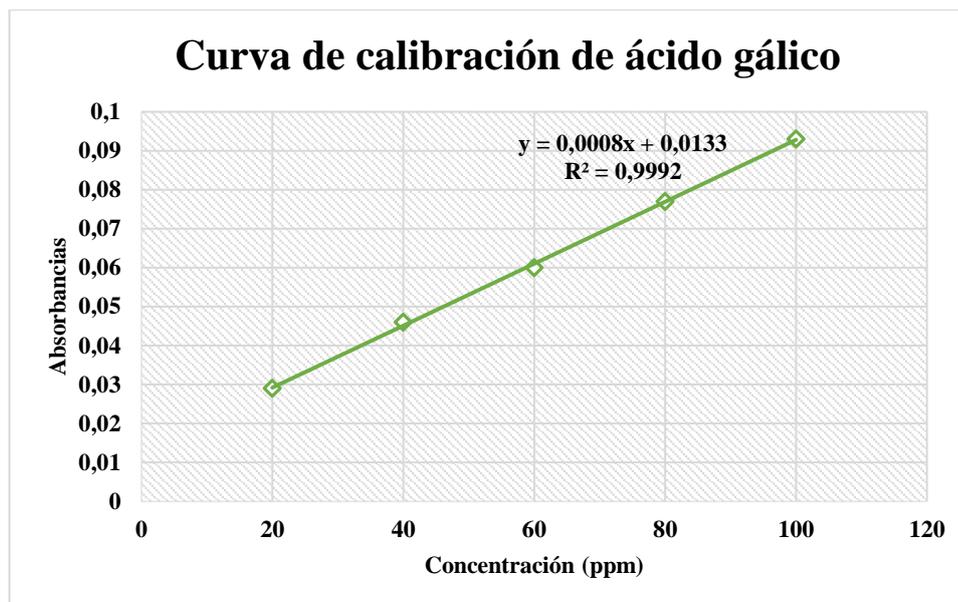


Gráfico 1-3. Curva de calibración de ácido gálico

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Tabla 9-3. Resultado de la cuantificación de fenoles totales de los extractos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis*.

Sustancia con actividad fotoprotectora	FENOLES TOTALES	
	mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de planta	Porcentaje (%)
Extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>	137,404 ± 0,082	13,740 ± 0,008
Extracto etanólico de <i>Passiflora quadrangularis</i>	142,77 ± 0,0	14,27 ± 0,0

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Como se muestra en la tabla 9-3 el contenido de fenoles totales para *B. andicola* fue de 137,404 ± 0,082mg equivalentes de ácido gálico/g de planta seca (13,740 ± 0,008 %) evidenciándose un elevado contenido de compuestos fenólicos. Haciendo referencia a los datos de bibliografía, como el caso del estudio realizado por (Vinueza, et al., 2017), en el cual se indica el valor de contenido de fenoles tales expresado como QE/100g de planta fue de 12.058%±0.274.

El resultado del contenido de fenoles totales para *P. quadrangularis* fue de 142,77 ± 0,0 (Tabla 9-3), lo que se comprueba con lo indicado en bibliografía, según el estudio realizado por (Muñoz, 2016) en el que registraron como valor de fenoles expresado como mg equivalentes de ácido

gálico/g de planta fue de 131.11 ± 1.93 . Además se corroboró que las plantas de la familia de las *Passifloraceas* presentan entre sus principales componentes a los fenoles.

El valor obtenido de este parámetro representa un indicativo de la propiedad fotoprotectora de estas plantas debido a acción antioxidante de tales compuestos fenólicos.

3.5 Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales se utilizó el método colorimétrico con tricloruro de aluminio, de este modo se elaboró una curva de calibración usando como estándar la quercetina. La ecuación resultante fue: $y = 0,002x + 0,0056$ con un $R^2 = 0,9993$.

Tabla 10-3. Absorbancias del estándar de quercetina a diferentes concentraciones.

Concentración en ppm	Absorbancias
20	0,043
40	0,086
60	0,124
80	0,166
100	0,200

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

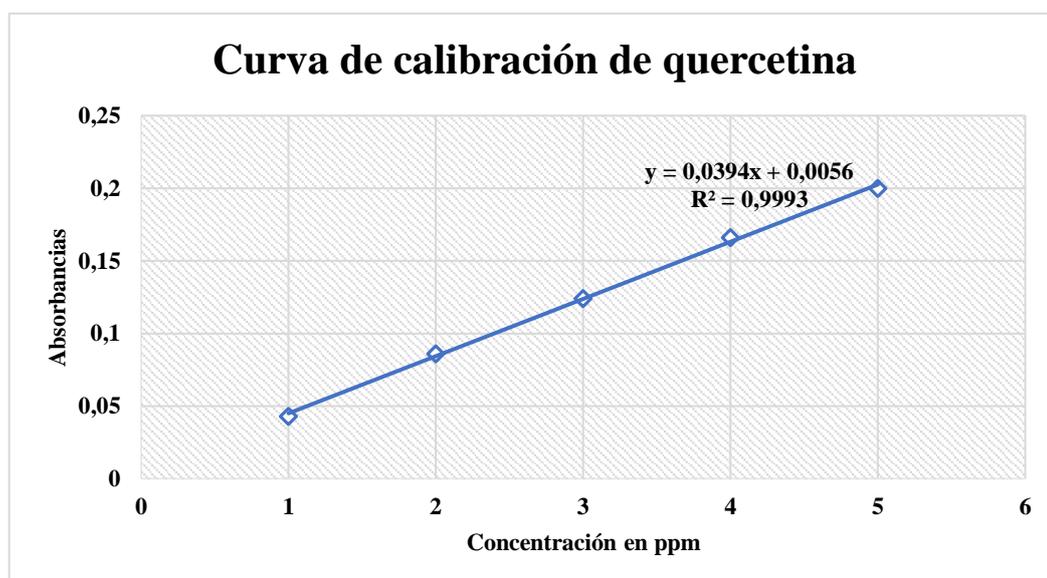


Gráfico 2-3. Curva de calibración de quercetina.

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Tabla 11-3. Resultado de la cuantificación de flavonoides totales de los extractos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis*.

Sustancia con actividad fotoprotectora	FLAVONOIDES TOTALES	
	mg Equivalentes de Quercetina/g de planta	Porcentaje (%)
Extracto hidroalcohólico de <i>Bidens andicola</i>	87,716 ± 0,401	8,772 ± 0,039
Extracto hidroalcohólico de <i>Passiflora quadrangularis</i>	13,98 ± 0,2	1,3 ± 0,01

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

El contenido de flavonoides del extracto hidroalcohólico de *Bidens andicola* fue 87, 712 ± 0,401 (Tabla 11-3) expresados como mg equivalentes de quercetina/g de planta el cual es muy parecido al reportado por (Vinueza , et al., 2017) con un valor de 9,987 ± 0,123 expresado como GAE/100g de planta. Los flavonoides identificados en las hojas de *B. andicola* en la investigación realizada por (De Tommasi, et al., 1998) fueron el flavonol 7-O-glucósidos con quercetina o quercetina 3-metil éter como sus agliconas y glicósido de éster de chalcona.

Para el caso de *P. quadrangularis* el valor obtenido fue de 13,98 ± 0,2 (Tabla 11-3), expresado como mg equivalentes de quercetina/g de planta el cual es parecido al reportados por (Muñoz, 2016) que fue de 11.76±0.0. En las hojas de esta especie de *Passiflora* se han identificado flavonoides tales como orientina, isorientina, vitexina, isovitexina en los cuales se ha observado mediante cultivos celulares la estimulación para su producción en presencia de radiaciones UV-B (Antognoni, et al., 2007).

3.6 Factor de protección solar (FPS)

Tabla 12-3. Resultados del FPS *in vitro*

Extractos etanólicos al 70%	FPS <i>in vitro</i>			
	20ppm	200ppm	500ppm	1000ppm
<i>Bidens andicola</i>	0,5	5	18	34
<i>Passiflora quadrangularis</i>	1	6	15	31

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

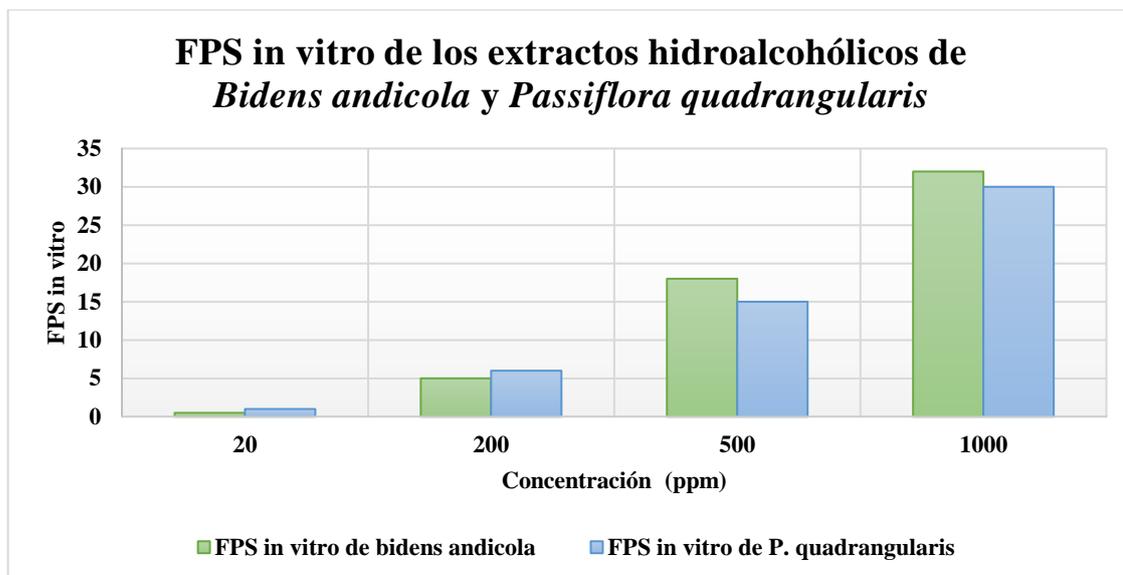


Gráfico 3-3. FPS *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de *B. andicola* y *P. quadrangularis*.

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Tabla 13-3. Tipo de fotoprotector según el FPS *in vitro* obtenido de los extractos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis*.

Extractos Hidroalcohólicos	FPS <i>in vitro</i> 1000ppm	Tipo de fotoprotector según las normas COLIPA
<i>Bidens andicola</i>	32	Muy Alto
<i>Passiflora quadrangularis</i>	30	Muy Alto

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Para determinar este parámetro se aplicó el método descrito por (Mansur, et al., 1986). El Factor de Protección Solar de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis* a la concentración de 1000ppm fue de 32 y 30 respectivamente (Tabla 13-3). De acuerdo con las normas COLIPA que indica que un valor de FPS entre 30-40-50 se categoriza como muy alto. Esto da una muestra del potencial que tiene estos extractos para su aplicación en la elaboración de productos cosméticos como lo son los fotoprotectores.

3.7 Ensayo de genotoxicidad en *Vicia faba*

Tabla 14-3. Resultados de la prueba de micronúcleos.

Tratamiento	Índice Mitótico 48 horas	Micronúcleos 48 horas
Control Positivo (Etanol)	2,966 ± 0,145	2,647 ± 0,194

Control Negativo (agua destilada)	26,467 ± 3,356	0
0,05% <i>B. andicola</i>	27,50 ± 3,279	0
0,05% <i>P. quadrangularis</i>	26,20 ± 1,436	0
0,1% <i>B. andicola</i>	25,367 ± 1,01	0
0,1 % <i>P. quadrangularis</i>	27,067 ± 2,142	0
0,2% <i>B. andicola</i>	25,10 ± 1,4	0
0,2 % <i>P. quadrangularis</i>	23,10 ± 0,569	0
0,4% <i>B. andicola</i>	22,333 ± 1,041	0
0,4% <i>P. quadrangularis</i>	25,860 ± 0,50	0
1% <i>B. andicola</i>	27,133 ± 1,01	0
1 % <i>P. quadrangularis</i>	23,00 ± 1,25	0

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

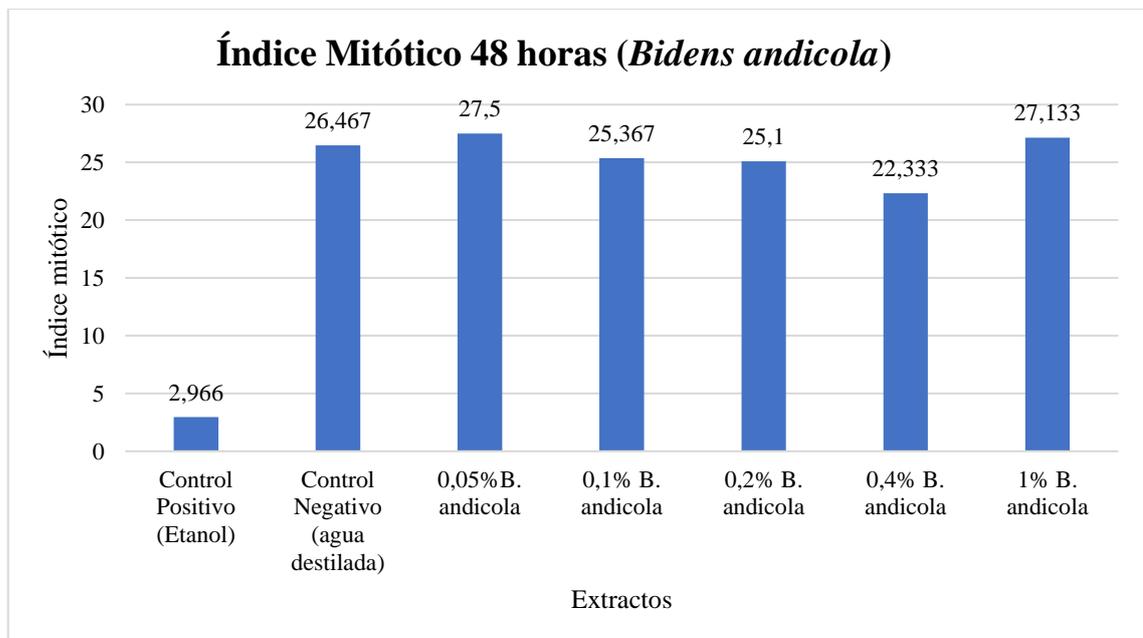


Gráfico 4-3. Índice mitótico a las 48 horas para los extractos de *Bidens andicola* y controles.

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

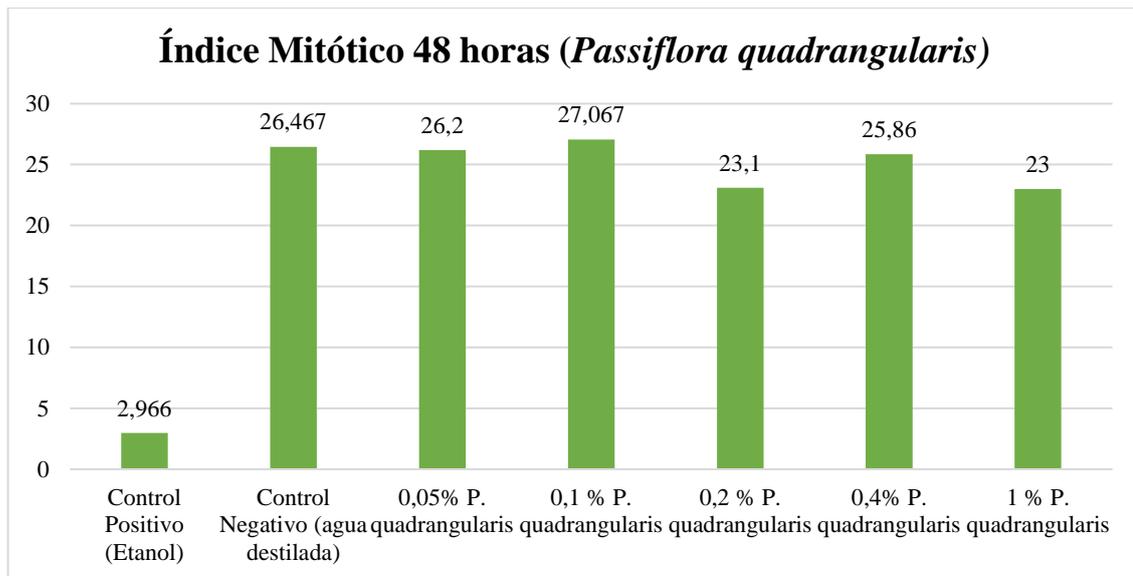


Gráfico 5-3. Índice mitótico a las 48 horas para los extractos de *Passiflora quadrangularis* y controles.

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

El tratamiento de las raíces con el control positivo (Etanol) mostró como resultado un valor de índice mitótico de $2,966 \pm 0,145$ (Tabla 14-3), esto indica que este agente provoca una disminución del proceso de división celular y generando la formación de micronúcleos de acuerdo con lo que se evidenció como resultado de este índice que fue de $2,647 \pm 0,194$ (Tabla 14-3). En este sentido las aberraciones cromosómicas que fueron observadas son de tipo aneugénicas, evidenciando cromosomas rezagados los mismos que observan groseramente reunidos, esto debido a que en la metafase no se ubicaron de manera ordenada en el plan ecuatorial (Beltrán & Gonza, 2017).

Con las respuestas celulares ante la exposición a los extractos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis*, preparados a diferentes concentraciones, se puede inferir en que, el proceso de mitosis no se ve comprometido dado que los resultados de índice mitótico se asemejan al obtenido con el control negativo (agua destilada) que fue de $26,467 \pm 3,356$ (Tabla 14-3). También se descartó el daño cromosómico durante la mitosis porque los micronúcleos utilizados como indicadores de efecto genotóxico fueron prácticamente ausentes en las raíces expuestas al control negativo y a las diferentes concentraciones de los extractos de las plantas ensayadas.

En base a los resultados obtenidos los extractos de *B. andicola* y *P. quadrangularis* no exhiben genotoxicidad haciendo posible su incorporación a formulaciones de fotoprotectores por ser seguros.

3.8 Análisis Estadístico de los datos del ensayo de genotoxicidad

Tabla 15.3. Factores inter-sujetos para el análisis de Micronúcleos (extractos de *B. andicola*)

TRATAMIENTO	Etiqueta de valor	N
1	0,05% <i>B. andicola</i>	3
2	0,1% <i>B. andicola</i>	3
3	0,2% <i>B. andicola</i>	3
4	0,4% <i>B. andicola</i>	3
5	1 % <i>B. andicola</i>	3
6	Control positivo (Etanol)	3

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Planteamiento de Hipótesis:

Ho: No existe diferencia en el desarrollo del índice mitótico entre las distintas concentraciones del extracto de *Bidens andicola* y los controles ($p \geq 0.05$)

H1: Existe diferencia en el desarrollo del índice mitótico entre las distintas concentraciones del extracto de *Bidens andicola* y los controles ($p \leq 0.05$)

Test de ANOVA de un factor

Tabla 16.3. Test de Anova de un factor para el índice mitótico

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1318,493	5	263,699	33,244	,000
Dentro de grupos	95,187	12	7,932		
Total	1413,680	17			

Elaborado por: Miguel Miranda, 2019.

Decisión:

El ANOVA de un factor indica que hay diferencias en la puntuación de índice mitótico (Tabla 16,3), de acuerdo con los tratamientos usados dado que $p < 0,05$. En este sentido se rechaza hipótesis nula y se concluye que no todas las medias son iguales.

Tabla 17.3. Prueba de Tukey para el análisis del índice mitótico

Prueba de Tukey

Extractos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control positivo	3	2,9667	
0,4%	3		22,3333
0,2%	3		25,1000
0,1%	3		25,3667
1%	3		27,1333
0,05%	3		27,5000
Sig.		1,000	,286

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

En base a la prueba de Tukey podemos identificar dos grupos el primero que corresponde al control positivo y el segundo a los diferentes extractos a los que se expusieron las raíces de *Vicia faba*.

Tabla 18.3. Factores inter-sujetos para el análisis de IM

TRATAMIENTO	Etiqueta de valor	N
1	0,05% <i>P. quadrangularis</i>	3
2	0,1% <i>P. quadrangularis</i>	3
3	0,2% <i>P. quadrangularis</i>	3
4	0,4% <i>P. quadrangularis</i>	3
5	1 % <i>P. quadrangularis</i>	3
6	Control positivo (Etanol)	3

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

Planteamiento de Hipótesis:

H₀: No existe diferencia en el desarrollo del índice mitótico entre las distintas concentraciones del extracto de *Passiflora quadrangularis* y los controles ($p \geq 0.05$)

H₁: Existe diferencia en el desarrollo del índice mitótico entre las distintas concentraciones del extracto de *Passiflora quadrangularis* y los controles ($p \leq 0.05$) Test de ANOVA de un factor.

Test de ANOVA de un factor

Tabla 19.3. Test de Anova de un factor para el índice mitótico.

ANOVA

IM

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1260,820	5	252,164	57,191	,000
Dentro de grupos	52,910	12	4,409		
Total	1313,730	17			

Elaborado por: Miguel Miranda, 2019.

El ANOVA de un factor indica que hay diferencias en la puntuación de índice mitótico (Tabla 19,3), de acuerdo con los tratamientos usados dado que $p < 0,05$. Por lo que se puede decir con un 95% de confianza, que para el Índice Mitótico y el Índice de Micronúcleos en al menos un par de tratamientos es diferente.

Tabla 20.3. Prueba de Tukey para el análisis del índice mitótico

PRUEBA DE TUKEY

Extractos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control positivo	3	2,9667	
1%	3		23,0000
0,2%	3		23,1000
0,4%	3		25,8600
0,05%	3		26,2000
0,1%	3		27,0667
Sig.		1,000	,240

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Realizado por: Miguel Miranda, 2019.

En base a la prueba de Tukey podemos identificar dos grupos el primero que corresponde al control positivo y el segundo a los diferentes extractos a los que se expusieron las raíces de *Vicia faba*.

3.9 Ensayo de irritación ocular por el método de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM)

Tabla 21-3. Resultado Prueba HET-CAM para *Bidens andicola* y *P. quadrangularis*.

Muestra	I.I (Índice de Irritación)	Valores de Referencia
NaOH (Control Positivo)	18,320 ± 0,186	0,0 - 0,9 No Irritante
Agua (Control Negativo)	0,00	1,0 - 4,9 Irritante Leve
<i>Bidens andicola</i> (250, 500 y 2000 ppm)	0,00	5,0 - 8,9 Irritante Moderado
<i>Passiflora quadrangularis</i> (250, 500 y 2000 ppm)	0,00	9,0 - 21,0 Irritante Severo

Realizado por: Miguel Miranda, 2019

Se determinó el potencial de irritación ocular *in vitro* de los extractos etanólicos de *B. andicola* y *P. quadrangularis* mediante el método HET-CAM. Para efecto de ello se observó durante 5min. la aparición de reacciones en la membrana corioalantoidea como la hemorragia, lisis de los vasos sanguíneos y coagulación. Con estos datos se calculó el índice de irritación ocular, obteniendo un valor de $18,320 \pm 0,186$ como se muestra en la tabla 21-3, para el control negativo que fue el NaOH, con dicho valor se ubica en la categoría de irritante severo según los valores de referencia de entre 9 y 21(Tabla 21-3).

En el caso del control positivo y los extractos de las plantas preparados a diferentes concentraciones se observaron valores de 0,00 siendo considerados como no irritantes (Tabla 21-3). En este sentido estos pueden ser incorporados a formulaciones de productos farmacéuticos y/o cosméticos.

3.10 Ensayo de irritación ocular por el método de la tinción con azul tripán de la membrana corioalantoidea (CAM-TBS)

Para este ensayo se elaboró previamente una curva de calibración a partir de los valores de absorbancia de concentraciones conocidas de azul tripán. Con ello se calculó la concentración de colorante en las muestras ensayadas.

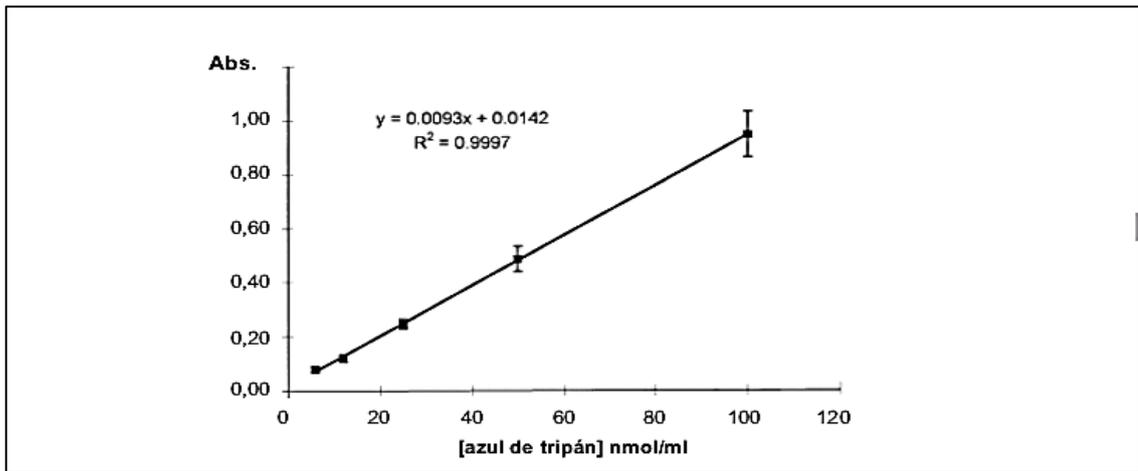


Gráfico 6-3. Curva de calibración de colorante azul tripán.

Fuente: (Mrtínez, 2007)

Tabla 22-3. Resultado Prueba CAM-TBS para *Bidens andicola* y *P. quadrangularis*.

Muestra	Cantidad de Colorante Absorbido (nm/mg)	Clasificación
NaOH 0,1N (Control Positivo)	0,347 ± 0,01	Irritante severo
Agua (Control Negativo)	0,015 ± 0,003	No irritante
<i>Bidens andicola</i> : 250ppm	0,0059 ± 0,001	No irritante
<i>Bidens andicola</i> : 500ppm	0,0068 ± 0,001	No irritante
<i>Bidens andicola</i> : 2000ppm	0,0078 ± 0,002	No irritante
<i>Passiflora quadrangularis</i> : 250ppm	0,0049 ± 0,001	No irritante
<i>Passiflora quadrangularis</i> 500ppm	0,0066 ± 0,0195	No irritante
<i>Passiflora quadrangularis</i> 2000 ppm	0,0082 ± 0,002	No irritante

Realizado por: Miguel Miranda, 2019

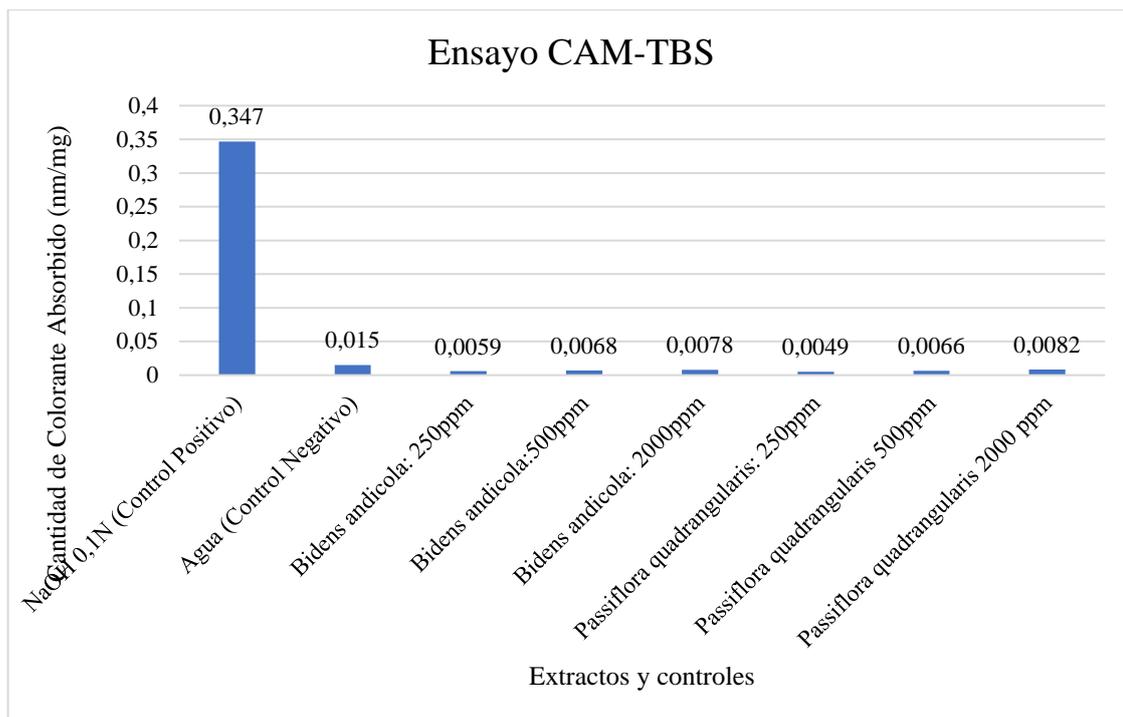


Gráfico 7-3. Resultados del ensayo CAM-TBS.

Fuente: (Mrtínez, 2007)

Se evaluó el potencial irritante *in vitro* mediante el método CAM-TBS de los extractos hidroalcohólicos de *B. andicola* y *P. quadrangularis*, además de los controles positivo y negativo. De este modo el valor obtenido como se indica en la tabla 22-3, para el control positivo (NaOH) fue de $0,347 \pm 0,01$ (nm/mg), lo que lo ubica dentro de la categoría de irritante severo según (Lagarto, et al., 2006), dado que el resultado obtenido es mayor a 0,150 por el contrario el control negativo (agua destilada) fue categorizado como no irritante con un resultado de $0,015 \pm 0,003$ ya que este es menor a 0,1.

Como se muestra en la tabla 22-3, en cuanto a los extractos de *B. andicola* preparados a diferentes concentraciones (250, 500, 2000ppm) fueron $0,0059 \pm 0,001$, $0,0068 \pm 0,001$, $0,0078 \pm 0,002$ y en el caso de *P. quadrangularis* los valores obtenidos fueron $0,0049 \pm 0,001$, $0,0066 \pm 0,0195$, $0,0082 \pm 0,002$. En ambos casos se clasifican como sustancias no irritantes debido a que los valores se encuentran por debajo de 0,100. Sin embargo no existen estudios realizados aplicando este método con los extractos hidroalcohólicos de estas dos plantas.

CONCLUSIONES

- Se determinó el factor de protección solar (FPS) con el método de Mansur, de los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola*, los cuales fueron de 30 y 32 respectivamente en los extractos preparados a una concentración de 2000ppm lo que les ubica dentro de la categoría de fotoprotectores muy altos según los datos de referencia establecido por las normas COLIPA.
- Se evaluó la posible genotoxicidad de los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola* mediante el ensayo de micronúcleos (MC) e índice mitótico (IM) y utilizando como bioindicador a las raíces de *Vicia faba var. minor*, en las cuales ante su exposición a los extractos de *Bidens andicola* y *Passiflora quadrangularis*, no se observó la inhibición de la mitosis, siendo los resultados de índice mitótico semejantes al del control negativo (agua destilada) que fue de $26,467 \pm 3,356$. También se descarta el daño cromosómico durante la mitosis porque los micronúcleos utilizados como bioindicadores estuvieron prácticamente ausentes en las raíces expuestas al control negativo y a las diferentes concentraciones de los extractos de las plantas ensayadas.
- Se pudo conocer el grado de irritación ocular de los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola* preparados a concentraciones de 250, 500 y 2000ppm, a través de ensayos sobre la membrana corioalantoidea HET-CAM y CAM-TBS. En el caso del ensayo HET-CAM los resultados mostraron que los extractos hidroalcohólicos de las dos plantas estudiadas no son irritantes puesto que no se observó ninguna reacción como hemorragia, lisis o coagulación cuando se aplicaron los extractos de las mismas a diferentes concentraciones, sobre la membrana corioalantoidea de los huevos de gallina. De igual manera en el ensayo CAM-TBS se clasificó los extractos como no irritantes esto debido a que los valores obtenidos fueron menores a 0,100.
- Al realizar los ensayos de genotoxicidad e irritación ocular se pudo evaluar la seguridad *in vitro* de los extractos de *Passiflora quadrangularis* y *Bidens andicola*, de acuerdo con esos resultados se pudo exhibir que los extractos hidroalcohólicos de las dos plantas objeto de estudio, pueden ser incorporadas a formulaciones de productos cosméticos con propiedades fotoprotectoras.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda combinar los dos extractos de *B. andicola* y *P. quadrangularis* en base a los resultados de eficacia y seguridad para de este modo evaluar si se genera algún efecto de sinergia o antagonismo en cuanto a la actividad fotoprotectora.
- Realizar ensayos *in vivo* para comparar con los resultados obtenidos *in vitro* y establecer si hay la existencia de posibles semejanzas o diferencias entre estos.
- Se recomienda realizar estudios de este tipo en otras especies vegetales con propiedades fotoprotectoras para de este modo ofrecer nuevas alternativas seguras para la adición a formulaciones de fotoprotectores que ayuden a mitigar los efectos nocivos de la radiación solar en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

ACS. *About Melanoma Skin Cancer.* [En línea] 2016. Disponible en : <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8823.00.pdf>

Agencia Espacial Civil Ecuatoriana. *El Informe HIPERIÓN.* [En línea]. 2008. disponible en: http://www.exa.ec/INFORME-HIPERION_files/INFORME-HIPERION.pdf

AIC. Definición Índice Ultravioleta. [En línea] 2010. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://www.aic.gob.ar/sitio/estacion-pcosta-datosdia>.

Antognoni, F., et.al. *Induction of flavonoid production by UV-B radiation in Passiflora quadrangularis callus cultures.* 2007, Elsevier, Vol. 78.

Argyropoulos, C., et.al. *Chemical composition of the essential oil from leaves of Lippia citriodora H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages.* 2007, Biochemical Systematics and Ecology, Vol. 12, págs. 831-837.

ARPANSA. Ultraviolet radiation. [En línea] [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://www.arpansa.gov.au/understanding-radiation/what-is-radiation/non-ionising-radiation/ultraviolet-radiation>.

Beltrán , R., & Gonza, K. *Citotoxicidad y genotoxicidad de las aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante el bioindicador ambiental y Moche mediante el bioindicador ambiental.* 2017, Scientia Agropecuaria, Vol. 8, págs. 203-213.

BRADLAW, J., & WILCOX, N. Workshop on eye irritation testing: practical applications of non-whole animal alternatives. 1997, Vol. 35, págs. 1-11.

Brannon, H. The Effects of Sun on the Skin. [En línea] 2018. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://www.verywellhealth.com/effects-of-sun-on-the-skin-1068724>.

Camones, M., Toscano Guerra, E., & Castañeda Castañeda, B. *Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método.* 2013, Horizonte Médico, Vol. 13, págs. 12-18.

Cedano , A., et.al. *LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE COMO BIOINDICADOR.* 2012, ABANICO VETERINARIO, Vol. 2.

Costa, A., García , B., & Moreno , R. *Espectro Solar y Manchas Solares.* s.l. : Publicaciones de NASE , 2018.

Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N., & Cedrón, J. *Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (Cynara scolymus L.)*. 2013, Revista de la Sociedad Química del Perú, Vol. 79.

De Tommasi, N., Piacente, S., & Pizza, C. *Flavonol and chalcone ester glycosides from Bidens andicola* 1998, J Nat Prod, Vol. 8, págs. 973-977.

Delgado, M., Uribe, M., Marulanda, A., & Marta, L. *ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CITOGÉNICA "SQUASH" PARA CONTEO DE LA TÉCNICA CITOGÉNICA "SQUASH" PARA CONTEO DE CROMOSOMAS MITÓTICOS EN Rubus glaucus Benth.* 2010, Scientia Et Technica, Vol. 17.

Dharmananda, S. BIDENS: A Popular Remedy Escapes Notice of Western Practitioners . [En línea] [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://www.itmonline.org/arts/bidens.htm>.

Echeverry, S. *Aporte a la estandarización del proceso de obtención de un extracto de hojas de Passiflora quadrangularis*. Bogotá : s.n., 2017.

Escamilla, C., Cuevas, E., & Guevara, E. *Flavonoides y sus acciones antioxidantes*. México DF : s.n., 2009.

Escobar, D. *Bidens andicola Kunth*. *Catálogo de la Biodiversidad*. [En línea] 2015. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://catalogo.biodiversidad.co/file/56cbd65e207ecea54a561e0d/summary>.

Espinoza, T., & Del Rosario, E. *Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética*. 2015.

EUPATI. Estudio de genotoxicidad. [En línea] 2015. [Citado el: 20 de julio de 2018.] <https://www.eupati.eu/es/glossary/estudio-de-genotoxicidad/>.

García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. *Determinación de polifenoles*. Valencia : s.n.

García, S. *Citotoxicidad y genotoxicidad de dos extractos*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires : s.n., 2003.

Gregersen, E. Ultraviolet radiation. [En línea] 2017. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://www.britannica.com/science/ultraviolet-radiation>.

Guillen, P., & Sarmiento, G. *VALIDACIÓN DE LAS METÓDICAS APLICADAS A LOS PROCESOS DE SELECCIÓN, LAVADO, SECADO Y ALMACENAMIENTO PARA PLANTAS MEDICINALES A TRAVÉS DE APLICACIÓN DE TÉCNICAS OFICIALES BASADAS EN LA*

FARMACOPEA DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Cuenca : s.n., 2011. pág. 31.

Hatanaka , Y., et.al. Arimuda, H. *Micronucleus test with cyclophosphamide using mouse peripheral blood.* 1992, Mutat Res, págs. 99-101.

Hernández, A. “PREPARACIÓN DE FILMS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDO CON FLAVONOIDES TOTALES DE ÑACHAK (*Bidens andicola*)”. Riobamba : s.n., 2018.

Huang , S., & Ng, L. *Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan.* 2012, Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 26, págs. 122-127.

ICCVAM. *Recommended Test Method Protocol: Hen’s Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method.* 2010.

IDEAM. RADIACIÓN SOLAR. [En línea] 2014. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/radiacion-solar>.

Ingale, A., & Hivrale, A. *Pharmacological studies of Passiflora sp. and their bioactive compounds.* 2010, African Journal of Plant Science Vol, Vol. 4, págs. 418-426.

INVITOX. *Protocol Number 108. CAM-TBS test.* s.l. : European Center for Validation of Alternative Methods ECVAM, 1996.

Itagaki, H., Hagino, S., & Kato, S. (*The Ergatt/Frame, data bank of in vitro.* 1995.

ITE. El espectro de radiación. [En línea] [Citado el: 30 de enero de 2019.] https://fjferrer.webs.ull.es/Apuntes3/Leccion02/3_el_espectro_de_radiacin.html.

Lagarto, A., Vega, R., & Gonzáles, R. *In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test.* 2006, Toxicol in vitro, Vol. 5, págs. 699-702.

Laignier, E., et.al. *Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation.* 2009, SCIELO, Vol. 45.

Lim, H., & Cooper, K. *The health impact of solar radiation and prevention strategies: Report of the Environment Council, American Academy of Dermatology.* 2000, J Am Acad Dermatol, Vol. 1.

Mansur , J., Breder, M., Mansur, M., & Azulay, R. *Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria / Correlation between the*

determination of sun protecting of factor in human beings and by spectrophotometry. 1986, An. Bras Dermatol, Vol. 61, págs. 167-72.

Malca, K y Matara, D. Universidad Nacional de Trujillo Desarrollo de una crema a base del extracto de *Passiflora quadrangularis* L. “tumbo” y evaluación in vitro de su efecto fotoprotector. [En línea] 2018. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10611>.

MCS. *Types of skin cancer.* Gales : [En línea] s.n. Disponible en: <https://www.macmillan.org.uk/information-and-support/skin-cancer/understanding-cancer/skin-cancer-types.html>

Mejía, J., Atehortúa, L., & Puertas, M. *Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares.* [En línea] 2014, DermatologíaCMQ, Vol. 12, págs. 272-281. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm144i.pdf>

Miño, L. *Investigación fitoquímica e identificación del principio activo en 6 especies del género Bacharis.* Quito : ESPE, 2007.

Miranda , M., & Cuellar, A. *Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales.* La Habana : Félix Varela, 2000. págs. 70-110.

Martínez, V. Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácido. 2007.

Mukherjee, P. *Quality Control of Herbal Drugs. An Approach to.* New Delhi : Horizons, 2008.

Muñoz, D. “*ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE HOJAS Y FLORES DE Passiflora quadrangularis*”. Riobamba : s.n., [En línea]. 2016. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5017/1/56T00634%20UDCTFC.pdf>

Nagle, M. *The effects of ultra violet radiation on the eyes.* [En línea]. 2012. Disponible en: http://www.ehrn.co.za/sunsmart/download/symposium2012_03.pdf

Navarrete, G. El cáncer de piel es uno de los más frecuentes en el país. [En línea] 2018. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://www.elnorte.ec/ibarra/el-cancer-de-piel-es-uno-de-los-mas-frecuentes-en-el-pais-AC74688>.

Nichols , J., & Katiyar , S. *Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms.* 2010, Arch Dermatol Res., Vol. 2.

OMS, OMM, & UNEP. *ÍNDICE UV SOLAR MUNDIAL: Guía práctica.* [En línea]. 2003 [Citado el 30 de enero de 2019] de <https://www.who.int/uv/publications/en/uvispa.pdf>

- Ordóñez, V.** *Biodiversity and Cultural Diversity in the Andes and Amazon.* 2006, Vol. 10.
- Orsini, F., Pellizzoni, F., Ricca, G., & Verotta, L.** *Triterpene glycosides related to.* 1987, *Phytochemistry*, Vol. 4, págs. 1101–1105.
- Palli, F.** *Passiflora quadrangularis.* [En línea] [Citado el: 30 de enero de 2019.]
- Pozo, M.** Estudio-etnobotánico, de plantas medicinales. [En línea] 2013. [Citado el: 19 de julio de 2018.] <http://www.utn.edu.ec/ficayaemprende/?p=73>.
- Randy, M., & Gordon, M.** *Skin Cancer: More than Skin Deep.* [En línea] 2009. Disponible en <https://nursing.ceconnection.com/ovidfiles/00129334-200912000-00014.pdf>
- Reichrath, J.** *The challenge resulting from positive and negative effects of.* *Prog Biophys Mol Biol.* 2006. págs. 9-19.
- Reichrath, J., & Nürnberg, B.** Understanding positive and negative effects of solar UV-radiation: A challenge and a fascinating perspective. Hamburgo : s.n., 2008.
- Reis Mansur, M., et.al.** *In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts.* Río de Janeiro : s.n., 2016, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 26, págs. 251-258.
- Ren, Y., et.al.** Tototoxic and NF-kappaB inhibitory constituents of *Artocarpus rigida*. 2010. *J Nat Prod*, 5(73).
- Rondón, L., Frías, J., & Almeida, M.** *Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de hojas y flores de la Turnera UlmifoliaL.* 2010, *QuímicaViva*, págs. 24-27.
- Ros-Usó.** ¿QUÉ ES Y PARA QUE SIRVE UN FOTOPROTECTOR SOLAR? [En línea] [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://farmaciarosuso.es/que-es-y-para-que-sirve-un-fotoprotector-solar/>.
- Rouleau, R.** Chemical Vs. Physical Sunscreens: Pros And Cons. [En línea] 2018. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://blog.reneerouleau.com/chemical-vs-physical-sunscreens-pros-cons/>.
- Saewan, N., & Jimtaisong, A.** *El sol y los filtros solares.* 2003, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 3.
- Sakalem, M., Negri, G., & Tabach, R.** *Chemical composition of hydroethanolic.* 2011, págs. 1219–1232.
- Sánchez, J., et.al.** *Inducción de micronúcleos en células meristemáticas de la raíz de la faba tratadas con diferentes concentraciones de marvel®.* 2017, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, págs. 95-106.

Sánchez, M. Radiación solar en el planeta Tierra. [En línea] 2015. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://www.meteorologiaenred.com/radiacion-solar-en-el-planeta-tierra.html>.

Sari, F. Carcinoma de Células Escamosas. [En línea] [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://cancerdepiel.org/cancer-de-piel/carcinoma-de-celulas-escamosas>.

Sayre, R., Desrochers, D., & Marlow, E. *Sunscreen testing methods: in vitro*. 1980, J. Soc. Cosmet. Chem, Vol. 1, págs. 133-43.

SCF. *Carcinoma de Células Escamosas*. Recuperado el 30 de enero de 2019, de <http://cancerdepiel.org/cancer-de-piel/carcinoma-de-celulas-escamosas>

Schalka, S., & Silva, V. *Sun protection factor: meaning and controversies*. 2010, Anais Brasileiros de Dermatologia, Vol. 3.

Society, A. C. What Is Ultraviolet (UV) Radiation? [En línea] 2017. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://www.cancer.org/cancer/skin-cancer/prevention-and-early-detection/what-is-uv-radiation.html>.

Spielmann, H., & Liebsch, M. HET-CAM TEST. Berlin, Alemania : s.n., 2004.

Stengel F, S. Nueva Clasificación FPS Productos Europeos -Límite Superior Recomendación COLIPA # 11, Junio 2002. Su aplicación obligatoria 2006. 2006. Vol. 58, 5.

Strickland, M., & Croager, E. *Cancer Council WA's UV Index Campaign*. [En línea]. 2013. [Citado el 30 de enero del 2019] de <https://www.cancerwa.asn.au/resources/2013-04-10-uv-radiation-learning-activities-book.pdf>

Taha, M., & Abdennour, S. *HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries*. 2017, Toxicology in Vitro, págs. 393-396.

Taype, E. “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética”. Lima : s.n., 2015. págs. 57-58.

Tazzini, N. FLAVONOIDS: DEFINITION, STRUCTURE AND CLASSIFICATION. [En línea] 2014. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <http://www.tuscany-diet.net/2014/01/22/flavonoids-definition-structure-classification/#Chemical-structure-of-flavonoids>.

TEMIS. *UV index forecast and archives*. [En línea] 2019. disponible en: <http://www.temis.nl/uvradiation/UVindex.html>

UNID. *TAMIZAJE Y SCREENING FITOQUIMICO*. Lima : s.n., [En línea] 2016. Disponible en: http://www.academia.edu/25502053/TAMIZAJE_FITOQUIMICO

Urteaga , F., & Lallana, V. (2005). *OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE TINCIÓN PARA DETERMINACIÓN DE EFECTOS CITOGENÉTICOS EN ÁPICES RADICALES DE ALLIUM CEPA **. [En línea] 2005, Revista Científica Agropecuaria, Vol. 1, págs. 63-70.[Citado el 28 de enero de 2019] de http://www.fca.uner.edu.ar/rca/Volumenes%20Anteriores/Vol%20Ante%209/rca_9_1_pdf/NRCA_90_F.pdf?fbclid=IwAROL3W8rZ7Be4s0-NYdMIYdW8ypi05Iy6zPIRXkhCvqan5YLHGvBApAsb2g

Valencia , R., et.al. *GENOTOXICIDAD DE PLAGUICIDAS EN SISTEMAS VEGETALES*. 2013, Rev. Int. Contam. Ambie., págs. 133-157.

Vasconcelos, A., Vega, E., & Pérez, Y. *Conjugation of cell-penetrating peptides with poly(Lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery*. 2015, International Journal of Nanomedicine, pág. 609.

Vicente, A. *Diferentes efectos de la radiación UV en la conjuntiva ocular y córnea*. [en línea] 2011. Disponible en: <http://www.anavicenteymas.com/2011/07/lentes-de-contacto-con-filtro-uv-para-una-proteccion-total>

Vinueza , D., López, E., Acosta, K., & Abdo , S. *ASSESSMENT OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF FREEZE DRIED*. Riobamba : s.n., 2017, ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH, Vol. 10.

Wang, H., & Diepgen, T. *The Epidemiology of basal cell and squamous cell*. [ed.] J Reichrath . bERLIN : Landes Bioscience Medical Intelligence Unit, 2006.

WHO. SOLAR RADIATION AND HUMAN HEALTH. [En línea] 1999. [Citado el: 30 de enero de 2019.] <https://www.who.int/uv/resources/fact/en/fs227toomuchsun.pdf>.

Wilson, S., Ahearne, M., & Hopkinson, A. *An overview of current techniques for ocular toxicity testing*. 2015, Toxicology, págs. 32-46.

Zeman, G. Ultraviolet Radiation. *HPS.org*. [En línea] [Citado el: 30 de enero de 2018.] <https://hps.org/hpspublications/articles/uv.html>.

ANEXOS

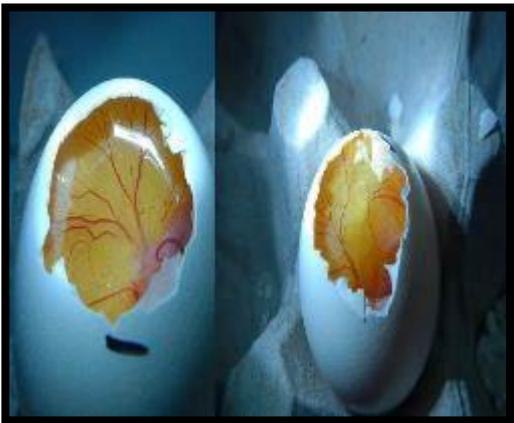
Anexo A: Evidencias fotográficas de la investigación.

	
<p>Secado del material vegetal (porción aérea de <i>Bidens andicola</i> y hojas de <i>Passiflora quadrangularis</i>)</p>	<p>Molienda del material vegetal</p>
	
<p>Control de calidad del material vegetal</p>	<p>Tamizaje fitoquímico</p>
	
<p>Concentración de los extractos en el rotavapor</p>	<p>Preparación de muestras para determinar el contenido de fenoles totales</p>



Ensayo HET-CAM con los extractos hidroalcohólico de *B. andicola* y de *P. quadrangularis*.

Ensayo HET CAM: Izquierda: Control negativo (agua destilada). Derecha control positivo (NaOH).



Membrana corialantoidea después de la aplicación de los extractos a la izquierda de *B. andicola* y a la derecha de *P. quadrangularis* cada uno preparado a 2000ppm.

Ensayo CAM-TBS



Ensayo de genotoxicidad



Células en las diferentes fases de la mitosis



Cromosomas rezagados (raíces expuestas al control positivo)

Certificado de identificación de las especies vegetales

**HERBARIO POLITECNICO CHIMBORAZO (CHEP)**
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@yahoo.com
Quimsa Ecuador

CERTIFICADO

Msc. Karen Acosta 21 de enero del 2019

RESPONSABLE TÉCNICA
CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente certifico que dentro del **Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos** asignado con el : Nro-MAE-DNB-CM-2018-0086. que al señor José Miguel Miranda Freire con CI: 180538302-1, Tesista de Bioquímica y Farmacia, se identificó las especie: *Bidens andicola* Kunth, *Passiflora quadrangularis* L., Las especies se identificaron y se revizó en los registros del herbario. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y el interesado puedo usar el presente certificado como crea conveniente

Atte.


Ing. Jorge Caranqui Msc.
BOTANICO
HERBARIO ESPOCH

HERBARIO POLITECNICO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES