



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA IN VITRO DE
EXTRACTOS DE ALISO (*Alnus acuminata*) CON DISTINTA POLARIDAD.”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR:

YOLANDA VERÓNICA BUENAÑO SUÁREZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado a las personas más importantes de mi vida, que con su paciencia, amor, comprensión y ternura han estado siempre apoyándome.

A mi esposo por ser el pilar fundamental para poder cumplir mi sueño tan anhelado, y por ser amigo y compañero inseparable.

Al amor de mi vida mi hija Domenica por la motivación para nunca rendirme y culminar con mi carrera.

A mis padres por sus consejos, valores, amor y haberme guiado durante toda la vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida. A mis padres Miguel y Carmen, por ser mi guía durante toda mi vida estudiantil. A mi hija Domenica por ser la razón de mi vida. A mi esposo Gustavo por todo el amor y la comprensión. A un ser especial que ya no está con migo Teresita por toda su ayuda, esfuerzo y cariño. A Vicente y a Vinicio por su ayuda incondicional. A mis hermanos que de una u otra manera han estado prestándome su ayuda. Y a mis amigas por compartir buenos momentos. A mi Tutor y colaborador de tesis a la Doctora Susana Abdo y Bioquímico Diego Vinuesa por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente tesis. Al Bioquímico Carlitos Pazmiño por el gran aporte brindado para la elaboración del trabajo. A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación “**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA IN VITRO DE EXTRACTOS DE ALISO (*Alnus acuminata*) CON DISTINTA POLARIDAD**”, de responsabilidad de la señorita egresada Yolanda Verónica Buenaño Suárez, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizado su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Cesar Avalos DECANO FAC.CIENCIAS	_____	_____
Dra. Ana Albuja DIRECTORA DE ESCUELA	_____	_____
Dra. Susana Abdo DIRECTORA DE TESIS	_____	_____
BQF. Diego Vinueza MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
BQF. Fausto Contero MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACION	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo, **Yolanda Verónica Buenaño Suárez**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO.

YOLANDA VERÓNICA BUENAÑO SUÁREZ

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue comprobar la actividad fotoprotectora del Aliso (*Alnus acuminata*) mediante estudios “in vitro”, utilizando solventes de distinta polaridad, los mismos que fueron elaborados en el laboratorio de productos naturales y en el laboratorio de microbiología ambiental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para desarrollar un producto fitocosmético que evite la degeneración de la piel a causa de la radiación UV. Se realizaron los extractos y subextractos Q 1.89 (Hexano), Q 4.34 (Éteretílico), Q 6.02 (Acetato de etilo), Q 14.0 (Acetato De Etilo + Etanol), Q 18 (Acetato de etilo+ etanol), Q 24.3 (etanol) y Q78.3 (Agua) los mismos que fueron evaluados mediante el espectro UV-Visible a una concentración de 20ppm en un rango entre 200 a 400nm, luego mediante TLC se identificó compuestos fenólicos como la quercetina que se comparó con su estándar y el ácido ferúlico por su Rf. Posteriormente se determinó el efecto fotoprotector por muerte celular en *Escherichia coli*, inducido por rayos UV, durante 30 minutos, a los subextractos Q 6.02, Q 14.0 y Q78.3, además se analizó el FPS espectroscópicamente mediante la aplicación de la ecuación de Mansur. Dando como resultado que los sub-extractos Q 6.02, Q14.0 y Q78.3 poseen los picos más pronunciados y las colonias sobrevivientes fueron de $3,6 \times 10^7$ UFC; $3,2 \times 10^7$ UFC y $1,6 \times 10^7$ UFC respectivamente, y el FPS (Factor de Protección Solar) de los tres sub-extractos fueron de 13.27; 9.75 y 8.29 comparado con un fotoprotector comercial el PABA que obtuvo el 12.37, por lo tanto se demuestra que el mejor sub-extracto que posee actividad fotoprotectora mediante técnicas in vitro es el Q6.02 (Acetato de etilo), ya que presentó la mayor cantidad de bacterias sobrevivientes y el FPS fue 13.27, por lo que se recomienda que el sub-extracto sea aplicado en la industria cosmética.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine the photoprotective activity of Aliso (*Alnus acuminata*) through studies, "in vitro" using solvents of different polarity, the same as they were developed in the laboratory of natural products and in the laboratory, for environmental microbiology the Polytechnic School of Chimborazo to develop a fitocosmético product that prevents skin degeneration due to UV radiation. Extracts and sub-extracts Q 1.89 (Hexane) Q 4.34 (Ethyl ether) were performed, Q 6.02 (Ethyl acetate), Q 14.0 (ethyl acetate + ethanol), Q18 (Ethyl acetate + ethanol) Q 24.3 (Ethanol) and Q78.3 (Water) thereof were evaluated by UV-visible spectrum at a concentration of 20 ppm in the range 200 to 400 nm, then by TLC phenolic compounds were identified as quercetin which was compared with the standard and the ferulic acid by its Rf. Subsequently the photoresist effect on cell death was determined; in *Escherichia coli*, induced by UV rays for 30 minutes, to sub-extracts Q 6.02, Q14.0 and Q 78.3, the FPS further analyzed spectroscopically by applying the equation of Mansour. Resulting, that: Q 6.02 sub-extracts, Q 14.0 and Q 78.3 have the most pronounced peaks and the surviving colonies were 3.6×10^7 UFC; 3.2×10^7 UFC and 1.6×10^7 UFC respectively, and the SPF (Sun Protection Factor) of the three sub-extracts were 13.27; 9.75 and 8.29 compared to a commercial photoresist PABA obtained 12.37 therefore it is demonstrated that the best sub-extract, which has photoprotective activity using in vitro techniques is Q 6.02 (Ethyl acetate), because it had the highest number of surviving bacteria and the FPS was 13.27, so it is recommended that the sub-extract be applied on the cosmetics industry.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	Radiación ultravioleta.....	1
1.1.1	Tipos de radiación solar.....	1
1.1.2	Consecuencias de la radiación ultravioleta en seres humanos.....	2
1.1.3	Factores que determinan la intensidad de los rayos ultravioletas	3
1.2	Fotoprotección	3
1.2.1	Tipos de fotoprotectores	4
1.2.2	Factores que influyen en la eficacia de los fotoprotectores.....	5
1.3	Factor de protección solar (FPS).....	6
1.4	Espectrofotometría ultravioleta.....	6
1.5	Cromatografía	7
1.5.1	Absorbentes y eluyentes	8
1.5.2	Determinación del Rf	8
1.6	Aliso (<i>Alnus acuminata</i>).....	9
1.6.1	Clasificación científica	9
1.6.2	Características botánicas.....	9
1.6.3	Origen y distribución.....	- 10
1.6.4	Propiedades terapéuticas.....	- 10
1.6.5	Composición química del aliso (<i>Alnus acuminata</i>)	- 12
1.7	Efecto de la radiación UV sobre los vegetales.....	- 14
1.8	Compuestos naturales con efecto fotoprotector	- 14
1.8.1	Compuestos fenólicos.....	- 15

2.	PARTE EXPERIMENTAL	- 21 -
2.1	Lugar de investigación	- 21 -
2.2	Muestras, equipos y reactivos	- 21 -
2.2.1	Muestras.....	- 21 -
2.2.2	Equipos	- 21 -
2.2.3	Reactivos.....	- 22 -
2.3	Técnicas y métodos	- 22 -
2.3.1	Muestras.....	- 22 -
2.3.2	Análisis físico químico del aliso (<i>Alnus acuminata</i>), como droga seca	- 23 -
2.3.3	Elaboración de los extractos	- 23 -
2.3.4	Determinación del pH de los extractos fraccionados	- 25 -
2.3.5	Screening fitoquímico	- 25 -
2.3.6	Determinación de metabolitos por espectrofotometría UV-Vis	- 27 -
2.3.7	Determinación de metabolitos por cromatografía de capa fina (TLC) .	- 27 -
2.3.8	Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría.....	- 28 -
2.3.9	Actividad fotoprotectora y FPS in vitro	- 29 -
2.3.11	Factor de protección solar (FSP) por espectrofotometría en la luz UVB	- 35 -
3.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	- 37 -
3.1	Análisis físico químico del de aliso (<i>Alnus acuminata</i>), como droga seca	- 37 -
3.2	Elaboración de extractos con distinta polaridad	- 38 -
3.4	Sreening fitoquímico	- 39 -
3.5	Determinación de compuestos por espectrofotometría	- 40 -
3.6	Cromatografía en capa fina (TLC).....	- 43 -
3.7	Cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina	- 45 -
3.7.1	Placa preparativa para la purificación de quercetina.....	- 45 -
3.7.2	Purificación de compuestos	- 46 -
3.7.3	Barrido espectral de la cromatografía del extracto Q 6.02 (acetato de etilo), a una longitud de onda de 200 a 600 nm.	- 46 -
3.8	Evaluación del efecto fotoprotector por muerte celular en <i>Escherichia coli</i> inducido por rayos UVB.	- 48 -
3.9	Factor de protección solar (FSP) por espectrofotometría en la luz UVB	- 51 -
4.	CONCLUSIONES	- 53 -

5.	RECOMENDACIONES	- 55 -
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	- 56 -
7.	ANEXOS.....	- 63 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
FPS	Factor De Protección Solar
g	Gramos
Kg	Kilogramos
MED	Dosis Mínima de Eritema
mg	Miligramo
min.	Minuto
ml	Mililitro
m.s.n.m	Metros Sobre el Nivel del Mar
nm	Nanómetro
PABA	Acido Para Amino Benzoico
Q	Constante Dieléctrica
Q 1.89	Extracto Hexánico
Q 4.34	Sub-extracto Etéreo
Q 6.02	Sub-extracto Acetato de Etilo
Q 14	Sub-extracto (Acetato de etilo + etanol)
Q 18	Sub-extracto (Acetato de etilo + etanol)
Q 24.3	Sub-extracto Etanólico
Q 78.3	Sub-extracto Acuoso
Rev.	Revoluciones
UFC	Unidades Formadoras De Colonias
ul	Microlitro
um	Micrometro
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
M1	Muestra 1
M2	Muestra 2

M3

Muestra 3

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Espectros de fotoprotectores comerciales.....	- 7 -
TABLA No. 2	Valores normalizados utilizados para el cálculo del factor de protección solar	- 35 -
TABLA No. 3	Resultados del análisis físico químico del aliso (<i>Alnus acuminata</i>), como droga seca.....	- 37 -
TABLA No. 4	Determinación del pH de los extractos fraccionados obtenidos con distinta polaridad.....	- 38 -
TABLA No. 5	Resultados del espectro a una longitud de onda de 200 a 400 nm.	- 42 -
TABLA No. 6	Valores de Rf obtenidos a partir de la cromatografía.	- 44 -
TABLA No. 7	comparación de los Rf para la quercetina y el extracto Q 6.02 (acetato de etilo)..	- 46 -
TABLA No. 8	Cuantificación de flavonoides totales expresados en porcentaje de quercetina a una longitud de onda de 200 a 400 nm.	- 47 -
TABLA No. 9	Resultado de efecto fotoprotector en <i>E. coli</i> al exponer a la radiación UV..	- 49 -
TABLA No. 10	Prueba de Tukey al 5% de bacterias sobrevivientes a los rayos UV.....	- 50 -
TABLA No. 11	Valores del factor de protección solar (FSP) del control positivo (PABA), del extracto Q 6.02 (Acetato de etilo), Q 14(Acetato de etilo+ etanol) y Q 78.3 (Agua) calculados mediante la ecuación de Mansur.	- 51 -
TABLA No. 12	Prueba de Tukey al 5% del FPS.	- 52 -
TABLA No. 13	Actividad fotoprotectora en <i>E. coli</i> al inducir rayos UV.	- 66 -

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Clasificación científica del Aliso	- 9 -
CUADRO No. 2	Estructura de los componentes químicos del aliso	- 13 -
CUADRO No. 3	Compuestos naturales y fotoprotección.	- 14 -
CUADRO No. 4	Concentración de compuestos fenólicos en los vegetales	- 15 -
CUADRO No. 5	Espectro de absorción de los flavonoides.....	- 19 -
CUADRO No. 6	Procedimiento para el screening fitoquímico	- 25 -
CUADRO No. 7	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	- 30 -
CUADRO No. 8	Muestras de experimentación	- 34 -
CUADRO No. 9	Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos con diferente Q (Constante dieléctrica).	- 39 -
CUADRO No. 10	Barrido espectral de los extractos Q 1.89, Q 4.34, Q 6.02, Q 14.0, Q 18.0, Q 24.3 y Q 78.3 de la muestra de Aliso (<i>Alnus acuminata</i>).....	- 41 -
CUADRO No. 11	Comparación del espectro de absorción de la quercetina y el del extracto Q 6.02 (Acetato de etilo)	- 47 -

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Porcentaje de flavonoides obtenidos en cada extracto de Aliso (<i>Alnus acuminata</i>).....	- 48 -
GRÁFICO No. 2	Actividad fotoprotectora con <i>Escherichia coli</i> por irradiación UVB (312nm).....	- 50 -
GRÁFICO No. 3	Comparación del FPS entre el control positivo (PABA), el extracto Q 6.02 (Acetato de etilo), Q 14(Acetato de etilo+ etanol) y Q 78.3 (Agua).....	- 52 -

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	La radiación solar	- 1 -
FIGURA No. 2	Absorción de los rayos UV en relación con la longitud de onda	- 2 -

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Árbol de Aliso.....	- 9 -
FOTOGRAFÍA No. 2	Extractos Q6.02 (Acetato De Etilo), Q14 (Acetato de etilo + etanol y Q 78.3 (Agua).	- 32 -
FOTOGRAFÍA No. 3	Cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	- 32 -
FOTOGRAFÍA No. 4	Siembra de <i>E. coli</i> en agar sangre	- 32 -
FOTOGRAFÍA No. 5	Siembra de <i>E. coli</i> en agar base.....	- 34 -
FOTOGRAFÍA No. 6	Placa preparativa para la identificación de compuestos en el extracto Q 1.89 (Hexano) y en los extractos Q 4.34 (Éter etílico); Q 6.02 (Acetato de etilo); Q 18.0 (acetato DE etilo + ETANOL) Y Q 24.3 (ETANOL)	- 43 -
FOTOGRAFÍA No. 7	Placa preparativa para la identificación de compuestos en el extracto Q 14.0 (Acetato de etilo + etanol)	- 43 -
FOTOGRAFÍA No. 8	Cromatografía para el ácido ferúlico	- 45 -
FOTOGRAFÍA No. 9	TLC para la purificación de compuestos	- 45 -

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Obtención de los extractos Q 14 (Acetato de etilo+ etanol) y Q 18 (Acetato de etilo+ etanol).....	- 63 -
ANEXO No. 2	Elaboración de extractos	- 64 -
ANEXO No. 3	Determinación del pH.....	- 65 -
ANEXO No. 4	Purificación de compuestos.....	- 65 -
ANEXO No. 5	Actividad fotoprotectora en <i>E. coli</i>	- 66 -
ANEXO No. 6	Valores del factor de protección solar (FSP) del extracto Q 6.02 (acetato de etilo) calculados mediante la ecuación de Mansur. .	- 68 -
ANEXO No. 7	Valores del factor de protección solar (FSP) del extracto Q 14 (Acetato de etilo + etanol) calculados mediante la ecuación de Mansur.	- 68 -
ANEXO No. 8	Valores del factor de protección solar (FSP) del extracto Q 78.3 (agua) calculados mediante la ecuación de Mansur.	- 69 -
ANEXO No. 9	Valores del factor de protección solar (FSP) del control positivo (PABA) calculados mediante la ecuación de Mansur.	- 69 -
ANEXO No. 10	Análisis estadístico	- 70 -

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ha ido aumentando y a la vez el deterioro de la capa de ozono, por tal motivo los rayos ultravioleta atraviesan de forma más directa a la tierra, principalmente a la zona ecuatorial. (FROHNMEYER, H. y STRAIGER, D. 2003).

El Ecuador se ve afectado por la radiación UV debido a su posición geográfica y a la altitud en la cual se encuentra, constituyendo una verdadera amenaza, ya que a mayor altitud los rayos del sol atraviesan de forma más directa la capa de ozono afectando la superficie terrestre. (PUENTES, O. y otros 2002).

La exposición continua a esta radiación principalmente a los rayos UVB (290-320nm), producen afecciones a la piel como eritemas, cáncer de piel e incluso alteraciones en el ADN, además provocan estrés oxidativo. La radiación UVA (320-400nm) penetra en la dermis y epidermis de la piel generando radicales libres. (DE-GRUJIL, F. y otros. 1994).

La radiación ultravioleta es a la vez beneficiosa y perjudicial, ya que son indispensables para la vida en la tierra, pero también pueden generar un peligro potencial para la piel de las personas como quemaduras, eritemas, manchas en la piel, fotoenvejecimiento, cáncer de piel. (GONZÁLEZ Y GUERRA. 2010).

Con la finalidad de disminuir las afecciones en la piel por la exposición a los rayos UV se utilizan protectores solares que absorben la radiación. Los fotoprotectores, más utilizados son aquellos que tienen el grupo carbonilo conjugado que absorben los rayos UV y liberan energía con menor intensidad disminuyendo los efectos perjudiciales causados por la radiación solar.

Estudios en animales han demostrado que el uso de fotoprotectores químicos reducen los carcinomas en las personas. (BONINA F. y otros. 1996)

En la actualidad es indispensable la utilización de fotoprotectores, que formen una pantalla e impidan el paso de los rayos UV, y no causen efectos dañinos en la piel de las personas. En vista que en los últimos años se ha incrementado el índice de afecciones a la piel y además han provocado gran impacto ambiental (AGENCIA DE SANIDAD AMBIENTAL Y CONSUMO. 2009).

Por tal motivo, es necesaria la utilización de un fotoprotector con compuestos que no sean tóxicos y que no dañen el medio ambiente.

Extractos de sustancias naturales pueden reemplazar a los filtros solares químicos ya que se ha comprobado que absorben los rayos en la región del UV y además poseen poder antioxidante, en donde son utilizados los extractos de los vegetales para la elaboración de fitofármacos para poder así aprovechar sus propiedades farmacéuticas. (KALEMBA., KUNICKA 2003)

Los metabolitos secundarios como los flavonoides que se encuentran en la naturaleza en los vegetales, en las frutas y en el té verde protegen a las plantas de la radiación UV, además tienen la capacidad de reducir el daño oxidativo provocado por longitudes de onda corta y disminuyen la radiación UVB. (ROZEMA, J. 1997)

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad fotoprotectora in vitro de extractos de Aliso (*Alnus acuminata*) con distinta polaridad. Mediante ciertas pruebas como el screening fitoquímico, la cromatografía en capa fina, además la exposición de bacterias a la radiación UV, y el FPS aplicando ecuaciones matemáticas, con la finalidad de elaborar un fitocosmético que evite la degeneración de la piel a causa de la radiación UV.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

El sol genera radiaciones electromagnéticas, las mismas que atraviesan la capa de ozono y llegan a la tierra de diferentes formas. Una de estas radiaciones es la ultravioleta, la cual produce afecciones a la piel. (RUBINSTEIN, R. y otros. 1999)

La radiación UVB es la que produce efectos dañinos en la piel de las personas, que van desde el enrojecimiento, manchas, quemaduras y melanomas que desembocan en un cáncer de piel. (SPENCER, J., AMONETTE, R.1995).

De la radiación ultravioleta emitida por el sol alcanzan la superficie terrestre, la radiación UV B (comprendida entre 280 a 320 nm) y la UVA (315 a 400 nm), siendo consideradas como perjudiciales para las personas, por la continua exposición a la radiación UV, y la radiación UVC (200 a 290 nm) es la que posee efectos dañinos para la vida en la tierra, pero no atraviesa la capa de ozono. (APAZA, L. 2006)

1.1.1 TIPOS DE RADIACIÓN SOLAR

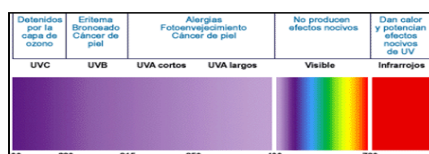


FIGURA No. 1 LA RADIACIÓN SOLAR

Fuente: MORA, M. 2010

Rayos UVC se encuentran a una longitud de onda de 200 a 290 nm, estos rayos son las más perjudiciales para la vida en la tierra pero no atraviesan la capa de ozono, siendo estos los responsables de eliminar los microorganismos, bacteria y virus.

Rayos UVA se encuentran dentro del espectro a una longitud de onda de 320 a 400 nm. Estos rayos atraviesan de forma más directa la piel provocando efectos a largo plazo, fotoenvejecimiento, alergias y cáncer de piel.

Luz visible: se encuentra dentro del espectro a una longitud de onda de 400 a 700 nm, según estudios realizados se ha comprobado que no son perjudiciales para las personas.

Infrarrojo se encuentran dentro del espectro a una longitud de onda de 700 a 3000 nm. La constante exposición a estos rayos, provoca efectos adversos serios para la piel humana. (APAZA, L. 2006)

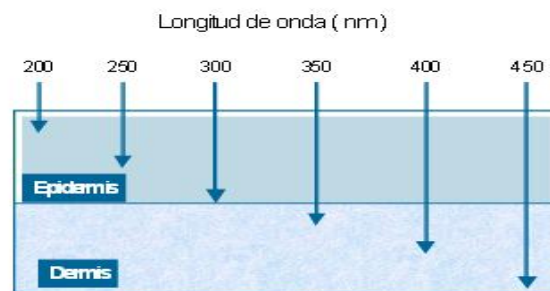


FIGURA No. 2 ABSORCIÓN DE LOS RAYOS UV EN RELACIÓN CON LA LONGITUD DE ONDA
FUENTE: MIRELES, H. 2000

1.1.2 CONSECUENCIAS DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN SERES HUMANOS.

La exposición continua a los rayos solares, representa el factor ambiental más perjudicial para la piel de las personas.

Los rayos UVB producen enfermedades y alteraciones en la piel como:

- Enrojecimiento
- Manchas
- Quemaduras

- Eritemas
- Alergias
- Pigmentación
- Fotoenvejecimiento
- Melanomas cutáneos
- Cáncer de piel

Especialmente si las exposiciones a estos rayos se dan en periodos tempranos de la vida como en la infancia. (APAZA, L. 2006)

1.1.3 FACTORES QUE DETERMINAN LA INTENSIDAD DE LOS RAYOS ULTRAVIOLETAS

- **La hora de exposición:** entre las once y las cuatro de la tarde es donde la intensidad de los rayos UV es mayor debido a que dichos rayos atraviesan de forma más perpendicular.
- **Altitud:** cuando mayor es la altitud de una región los rayos solares atraviesan de forma más directa, aumentando el 20% por cada 10000 pies de altura.
- **Condiciones climáticas:** la cantidad de nubes y la humedad determinan el paso de los rayos UV, es decir si se encuentra despejado el cielo, los rayos UV atraviesan de forma más directa a la tierra. (PUENTES, O. y otros. 2002).

1.2 FOTOPROTECCIÓN

La piel mediante la producción de melanina se protege de los rayos ultravioletas, es decir, que la piel de color blanco se quema con mayor facilidad que una piel de color negro. Además, el grosor de la capa superficial de la piel impide que los rayos solares atraviesen y causen irritaciones mayores como el cáncer de piel. (PARRISH, J. 1979)

La función primordial de la fotoprotección es impedir que los rayos ultravioletas, causen daño a las personas, es decir que no produzcan enrojecimiento, quemaduras y un posible cáncer de piel, ya sea a causa de la exposición continua a los rayos solares, o por no utilizar los medios adecuados de protección. (LOWE, N. 1990)

1.2.1 TIPOS DE FOTOPROTECTORES

De acuerdo a su mecanismo de acción

- **Protectores Químicos**

Estos fotoprotectores son aquellos que poseen compuestos aromáticos conjugados con un grupo carbonilo. Absorben los rayos ultravioletas de mayor energía (Longitud de onda corta) con excitación a un estado de energía superior. Al retornar al estado basal, la energía liberada es de menor magnitud (longitud de onda más larga).

- **Pantallas o Filtros Físicos**

Llamados también micronizados actúan mediante reflexión, dispersión y absorción, evitando así el paso de los rayos ultravioletas.

De acuerdo a sus características

- **PROTECTORES QUÍMICOS**

Filtros UVB

PABA Y Derivados: El ácido para amino benzoico es un compuesto hidrosoluble y es utilizado con un vehículo alcohólico. Presentan reacciones adversas como alergias en personas y además mancha la ropa.

Cinamatos: son los más utilizados por la industria cosmética ya que no presentan reacciones adversas.

Salicilatos: no son tan eficaces los fotoprotectores, tienen que estar en compañía de otros compuestos como el homosalicilato, presentan un gran perfil de seguridad.

FILTROS UVA

Benzofenona: es el fotoprotector utilizado con mayor frecuencia, además de absorber los rayos UVA también absorbe con mayor eficacia los rayos UVB.

Avobenzona: es el fotoprotector aprobado por la FDA para su uso, ya que no produce reacciones alérgicas.

- **PROTECTORES FÍSICOS O PANTALLAS**

Estos fotoprotectores poseen partículas microscópicas (20 – 150 nm), es imperceptible al ser aplicado sobre la piel, e impiden el paso de los rayos ultravioletas a la piel, siendo fotoestables y no producen reacciones adversas en la piel.

Oxido de Zinc: este fotoprotector está aprobado por la FDA. Ya que es seguro para la piel y no presenta reacciones adversas.

Dióxido de Titanio, Es un óxido metálico, y estudios realizados han demostrado que presenta fotosensibilidad por lo que da lugar a la formación de radicales libres. (MORA, M., 2010)

1.2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EFICACIA DE LOS FOTOPROTECTORES

- ✓ **Espectro de absorción:** los compuestos más eficaces son aquellos que poseen la mayor longitud de onda como los cinamatos.
- ✓ **Cantidad y método de aplicación:** la FDA recomienda aplicar 2 mg/cm² en la piel uniformemente y 15- 30 minutos antes de ser expuesto a los rayos del sol, ya que al aplicar menor cantidad habrá mayor riesgo de quemadura

- ✓ **Solubilidad en los Vehículos:** los fotoprotectores poseen de 2 a 6 sustancias químicas para lograr una concentración de 20 mg / ml sin que precipite y proteja con un FPS mayor o igual a 15 – 30. (IACHINI, A. y otros. 1973)

1.3 FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)

El factor de protección solar es la relación entre la energía ultravioleta requerida para producir una dosis mínima de eritema (MED) en la piel con protección, y la energía ultravioleta para producir una dosis mínima de eritema (MED) en la piel sin protección

$$FPS = \frac{\text{dosis mínima de eritema (MED) en la piel con protección}}{\text{dosis mínima de eritema (MED) en la piel sin protección}}$$

La dosis de eritema mínimo (MED), es la dosis de radiación de luz ultravioleta más bajo capaz de producir el mínimo eritema perceptible sobre la piel protegida.

El valor más alto de FPS proporciona mayor protección de la piel a los rayos ultravioletas. (DUTRA E. y otros. 2004)

1.4 ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA

Es el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda. (HARRIS, M. 2008)

En el espectro electromagnético las moléculas son sometidas a transiciones electrónicas. En donde esta técnica es complementaria al espectro fluorescente que se basa en las transiciones desde el estado basal al estado excitado. (HARRIS, M. 2008)

La espectrometría UV visible se utiliza para determinar iones metálicos de transición y determinar compuestos orgánicos que se encuentran en las sustancias los mismos que se denominan dienos conjugados.

Los disolventes empleados para poder ser observados en el espectrofotómetro deben ser los adecuados, como los compuestos polares como el agua y el alcohol para aquellos compuestos que son solubles en alcohol.

La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar a la absorción del espectro de un compuesto orgánico. (HARRIS, M. 2008)

1.4.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS FOTOPROTECTORES

TABLA No. 1 ESPECTROS DE FOTOPROTECTORES COMERCIALES

FILTROS	ACCION	ESPECTROS
Inorgánicos		
Oxido de zinc	380nm	UVA, UVB
Derivados del PABA		
PABA	283 nm	UVB
Octil dimetil PABA	311 nm	UVB
Cinamatos		
Octil metoxi cinamato	311 nm	UVB
Salicilatos		
Octil salicilato	307 nm	UVB

FUENTE: MORENO, M., MORENO, L. 2010

1.5 CROMATOGRAFÍA

Es una técnica utilizada para separar compuestos de una mezcla por sus diferencias de retención en una fase fija y otra por elución de un fluido que le atraviesa.

Las diferentes eluciones dependen a la mayor o menor solubilidad que en el disolvente que circulan y permiten separarlos. (YUFERA E.2007)

1.5.1 ABSORBENTES Y ELUYENTES

Los absorbentes más utilizados son el gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), los dos de características polares. La alúmina posee mayor fuerza de retención por los compuestos apolares como el hexano, éter, acetato de etilo. Y el del de sílice es utilizado para los compuestos polares como alcoholes, aminas y el agua.

La absorción de los compuestos se debe a la interacción molecular dipolo-dipolo o por los enlaces de hidrogeno entre el soluto y el absorbente.

1.5.2 DETERMINACIÓN DEL Rf

El Rf es la relación que existe entre la distancia recorrida por el solvente y la distancia recorrida por el eluyente desde el origen de la placa, y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.).

La distancia que es recorrida por la muestra se mide desde el centro de la mancha hasta el origen, si la mancha es muy grande el valor del Rf será incorrecto.

Para compuestos mediamente polares se recomienda escoger un disolvente apolar como el hexano.

En el caso de compuestos mediamente polares, se aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, requieren disolventes más polares como mezclas de acetato de etilo/metanol en distintas proporciones.

1.6 ALISO (*Alnus acuminata*)



FOTOGRAFÍA No.1 ÁRBOL DE ALISO.

FUENTE: BUENAÑO, Y. 2014

1.6.1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

CUADRO No. 1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DEL ALISO

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fagales
Familia:	Betulaceae
Género:	Alnus
Subgénero:	Alnus
Especie:	<i>A. acuminata</i>

ALISO EN SISTEMNAS SILVOPASTORALES. 2014

1.6.2 CARACTERÍSTICAS BOTANICAS

El Aliso es un árbol de 10 a 30 metros de alto, firme y que puede alcanzar una altura de 60 metros y un diámetro de un metro. La copa es estrecha. Las hojas son alternas y puntiagudas y con bordes finamente dentados.

Las flores aparecen en inflorescencias alargadas, los frutos tienen la forma de cono con escamas. (GEIFUS, F. 1994).

Es un árbol de altura media. Posee hojas de 6 a 12 cm de largo de color verde. Sus hojas son verdes hasta su caída y no cambian de color. Las flores aparecen antes de que tengan las hojas.

Esta vegetal crece fácilmente por las semillas y sus raíces son muy extendidas hacia la superficie. Absorbe bastante agua y sus raíces permanecen embebidas en el agua. Se ubican en las riberas de los ríos y a una altitud de 500 0 600 metros. (CENTRAL ECUATORIANA DE SERVICIOS AGRÍCOLAS 1993)

1.6.3 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El aliso está distribuido en toda Europa, Asia y noreste de África, en las orillas de los ríos, bosques, y sectores húmedos.

El vegetal se encuentra en Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Imbabura, Loja, Morona-Santiago, Napo, Pichincha, Tungurahua

A una altura de: 1500 a 4000 metros de altura. (CENTRAL ECUATORIANA DE SERVICIOS AGRÍCOLAS 1993)

1.6.4 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

Con las hojas secas del vegetal se prepara infusiones que se administra la gente para la gripe, fiebre y dolores de garganta. También es utilizada como antiséptico para eliminar los piojos, cuando se hace hervir la corteza del vegetal con vinagre. (CENTRAL ECUATORIANA DE SERVICIOS AGRÍCOLAS 1993)

Las especies del género *Alnus* es utilizado para tratar diversas enfermedades como el cáncer, la hepatitis, inflamación del útero, cáncer de útero, el reumatismo, la disentería, dolor de estómago, diarrea, fiebre, etc. (SATI, S. 2011)

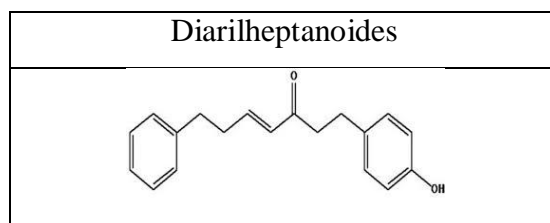
También es utilizado como cicatrizante. (CERÓN, C. 2006).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ALNUS

Estudios realizados en extractos crudos de etanol y agua demuestran la presencia de antioxidantes mediante diferentes pruebas como espectroscopia UV, RMN (Resonancia Magnética Nuclear) los compuestos aislados fueron glutinoin, pedunculagin y praecoxin. (SERGEY, A. y otros. 2012).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL *Alnus*

Según Middleton y otros., en el 2005 se demostró la actividad antibacteriana de *Alnus* en el extracto metanolico frente a diferentes especies bacterianas *Citrobacter freundii* NCTC 9750, *Escherichia coli* NCIMB 8110, *Escherichia coli* NCIMB 4174, *Klebsiella aerogenes* NCTC 9528, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 6376, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6750, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, y *Staphylococcus aureus* NCTC 11940 (MRSA), siendo más efectiva con *E. coli*. En estudios realizados por Saxena y otros., en 1995, se demostró que en la especie *A. rubra* se comprobó que los Diarilheptanoides y su glucósido (oregonin) le proporcionan la actividad.



FUENTE: WINUTHAYANON, W. 2009.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

En extractos metanolicos obtenidos de *Alnus acuminata* se han demostrado que poseen actividad antiinflamatoria mas alta comparada con estudios realizaos con indometacina, el fármaco de control positivo. Encontrándose algunos compuestos que presentaban la actividad como los triterpenoides y diarilheptanoides. (SATI, S. 2011)

TOXICIDAD DEL ALNUS

Se ensayaron pruebas en especies de *Alnus* para determinar la toxicidad general utilizando el ensayo de letalidad de gambas de salmuera por Middleton y otros. 2005. En donde los extractos demostraron bajos niveles de toxicidad hacia los camarones de salmuera.

INHIBICIÓN CONTRA EL VIH-1

Estudios realizados por Yu y otros., en el 2007 se comprobó que los triterpenos y flavonoides aislados del género de *Alnus* inhiben la replicación del virus del VIH-1 y controla las enzimas esenciales. Entre los extractos utilizados el extracto de metanol de hojas de *Alnus* mostró una inhibición potente contra el efecto citopático inducido por VIH-1 (CPE) en células MT-4 sobre la observación microscópica.

1.6.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ALISO (*Alnus acuminata*)

Según estudios realizados y determinaciones realizadas por HPLC se ha detectado la presencia de ciertos compuestos en el vegetal como son: los compuestos fenólicos como los flavonoides y derivados del ácido cinámico. (BENOIT, L. Y BERRY, A. 2006).

Los flavonoides que se encuentran en el vegetal son: flavonas, isoflavonas y flavanonas. También se ha reportado que existe diarilheptanoides, glucósidos (oregonin), quercetina, ácido ferúlico, ácido p-cumárico sesquiterpenoides.

En el género *Alnus* predominan los diarilheptanoides que poseen actividad antioxidante, actividad inhibidora frente de óxido nítrico y el efecto citopático inducido por el VIH-1 en células MT-4. (SATI, S. 2011)

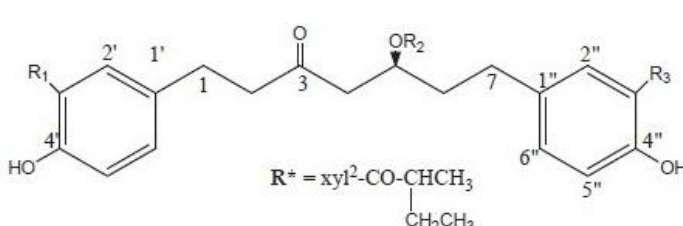
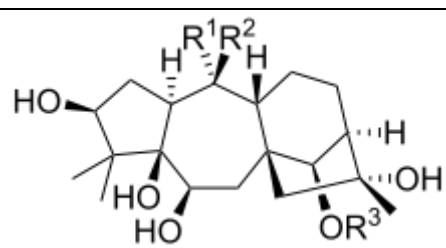
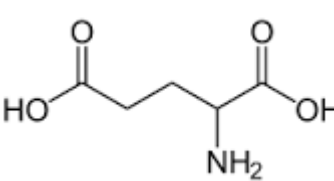
Los diarilheptanoides (hirsutenone, oregonin, (5S) -O-methylhirsutanonol, 2-oxatrycyclo [13.2.2.13,7] eicosa-3,5,7 , 15,17, 18-hexaen-10-16-diol, 2-oxatrycyclo [13.2.2.13,7]

eicosa-3,5,7, 15,17,18-hexaen-10-ona, garugamblin-3, L acerogenin , etc.) son bioactivos altamente potentes.

Posee también taninos que mostraron actividad hepatoprotectora en la dosis de 1 mg / kg, en comparación con la dosis de medicamentos que están hechas a base de flavonoides. (SATI, S. 2011)

Según estudios realizados en especies del genero Alnus se ha determinado la presencia de Hirsutanonol; oregonin; genkwanin ; rhododendrin {3-(4-hydroxyphenyl)-l-methylpropyl-β-D-glucopyranoside} y acido glutámico (2,3-acido pentadiendioico). (SATI, S. 2011).

CUADRO No. 2 ESTRUCTURA DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DEL ALISO

COMPUESTO	ESTRUCTURA
Hirsutanonol	 <p style="text-align: center;">$R^* = \text{xylyl}^2\text{-CO-CH(CH}_3\text{)CH}_2\text{CH}_3$</p> <p style="text-align: center;">$R_1 \text{ OH} \quad R_2 \text{ OH} \quad R_3 \text{ OH}$</p>
Rhododendrin {3-(4-hydroxyphenyl)-l-methylpropyl-β-D-glucopyranoside}	
Acido glutámico	

FUENTE: (SATI, S. 2011)

1.7 EFECTO DE LA RADIACIÓN UV SOBRE LOS VEGETALES

La radiación solar es absorbida por compuestos cromóforos o moléculas que se encuentran en las hojas de los vegetales, que son susceptibles a la radiación. (HUANG, L. y otros. 1993)

Las plantas monocotiledóneas que tienen hojas delgadas con orientación vertical interceptan menos la radiación UV-B que las dicotiledóneas ya que poseen hojas anchas y de orientación más bien horizontal, y por lo tanto son más susceptibles al daño.

Por lo que, las plantas monocotiledóneas soportan mas los niveles elevados de radiación UV-B.

Las plantas que están acondicionadas a altas radiaciones UVB, como las de alta montaña, se caracterizan principalmente por presentar tallos y ramas cortas, resultando plantas de morfología más bien compacta y de tamaño pequeño.(SEARLES, P. y otros. 1995) (YUE, M. 1998)

Las hojas que están expuestas a la radiación UV, aumentan en grosor como de la inducción de síntesis de lignina y otros polifenoles (TEVINI, M., TERAMURA, A. 1989) (LAPOSI, P. y otros. 2009)

1.8 COMPUESTOS NATURALES CON EFECTO FOTOPROTECTOR

CUADRO No. 3 COMPUESTOS NATURALES Y FOTOPROTECCIÓN.

Origen	Compuesto	Efecto sobre
Soja, ginkgo biloba	Flavonoides	Daño solar, fotocarcinogénesis
Aceite de oliva, vegetales.	Acido ferùlico	Eritema
Frutas, vegetales	Vitamina C	Eritema, fotoenvejecimiento
Aceites	Vitamina E	Fotocarcinogénesis
Árbol de té	Té verde, té negro	Eritema, fotoenvejecimiento

Fuente: MORENO, M., MORENO, L. 2010

Los compuestos naturales que poseen los vegetales son los metabolitos secundarios, son compuestos químicos de estructura compleja y de distribución restringida. (LOCK, O.1994).

Son un conjunto de reacciones que realizan las células para sintetizar sustancias a partir de sustancias más simples o para descomponer las sustancias complejas.

Tienen algunas propiedades y desempeñan muchas funciones y usos para la aplicación en fitofármacos u otros productos naturales. (ALONSO, J. 2004)

Entre los compuestos naturales que poseen actividad fotoprotectora tenemos a los fenoles.

1.8.1 COMPUESTOS FENÓLICOS

Son compuestos orgánicos que presentan un grupo OH unido a un anillo aromático.

Son relativamente polares y tienden a ser solubles en el agua, y poseen intensas coloraciones azul, verde, púrpura o negro al adicionar Cloruro Férrico.

Los compuestos fenólicos por su naturaleza aromática presentan intensa absorción en la región UV del espectro.

Los compuestos de esta familia presentan algunos beneficios para la salud como propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitumorales, antimicrobianas y antioxidantes. (MIRELES, H. 2000).

CUADRO No. 4 CONCENTRACION DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS VEGETALES

PARTE DEL VEGETAL	CONCENTRACIÓN
FRUTO	Acido cinámico, catequinas y flavonoides.
HOJAS	Flavonoides, acido cinámico, catequinas.
TRONCO	Catequinas, leucoantocianidinas, flavanoles.

CORTEZA	Al igual que en el tronco pero en mayores concentraciones.
---------	--

FUENTE: ROBARDS. 1999

Entre los principales compuestos fenólicos con actividad fotoprotectora están los derivados del ácido cinámico y los flavonoides.

1.8.1.1 Derivados del ácido cinámico.

Entre los derivados del ácido cinámico tenemos al ácido ferúlico que posee actividad antioxidante y fotoprotectora.

En la pared celular de los vegetales se encuentra el ácido ferúlico y el ácido cafeico en mayor porcentaje. Siendo el ácido ferúlico el que se encuentra en forma más abundante en la naturaleza. (SAIJA, A. y otros. 2000)

El ácido ferúlico es un antioxidante de origen vegetal derivado del ácido hidroxycinámico, que contrarresta a los radicales libres, los mismos que producen estrés oxidativo en las membranas celulares y el ADN, actúa protegiendo la estructura dérmica en donde se encuentra el colágeno y las fibras de elastina. (ACIDO FERÚLICO)

Según estudios de muestran que el ácido ferúlico en combinación con la vitamina C y E potencia su capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo y el fotoenvejecimiento que puede provocar cáncer de piel. (LEON, V., LEON, J.)

En estudios realizados se demuestra la actividad fotoprotectora del ácido ferúlico, en una formulación con ácido L-ascórbico 15%, alfa-tocoferol 1%, y ácido ferúlico 0,5% que al ser aplicada en las personas antes de someterse a la radiación UV por 4 días, se evidencio que hay protección significativa. Por tal motivo se demuestra que la combinación de estos ácidos tiene una potente acción antioxidante vegetal, es decir que previene el daño oxidativo causado por la radiación UV en la piel de las personas.

En el otro estudio se demostró que la combinación de vitamina C, ácido ferúlico y floretina. Aplicado de igual manera a la piel de las personas durante 4 días consecutivos

antes de la irradiación con un simulador, y se incrementó la dosis de eritema, comprobando que disminuyó el nivel de eritema. Por lo que concluyeron que la floretina no solo es un potente antioxidante sino que parece estabilizar y aumenta la biodisponibilidad en la piel de la vitamina C y el ácido ferúlico tópicos. (MURRAY, J. y otros. 2008)

1.8.1.2 Los flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, que están en forma abundante en los vegetales, siendo los principales compuestos quinonas y xantonas, debido a estos componentes es su color.

Los Flavonoides poseen quince átomos de carbono en su núcleo básico, y están representados mediante la siguiente fórmula: C₆ - C₃ -C₆.

La estructura general de los Flavonoides comprende un anillo A derivado de la cadena policétida (sustitución en patrón meta), un anillo B, derivado del ácido Shikímico, con sustitución en orto, los dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo que en caso de existir es llamado anillo C, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano. . (DOMINGUEZ, S., XORGE, A. 1993)

Los compuestos fenólicos se comportan como fotoprotectores en algunas plantas, por lo que se recomienda el consumo de verduras o suplementos alimenticios a base de estos compuestos.

Para que un fotoprotector sea eficiente debe tener un amplio espectro de absorción para que pueda cubrir diferentes longitudes de onda en la región del UV, ya sea en el UVA y en el UVC, además debe estar por un periodo prolongado de tiempo bajo la luz UV. (DALLACQUA, S. y otros. 2012)

La acción farmacológica de los flavonoides es muy extensa ya que es bien conocida por sus propiedades contra la caída del cabello y la fragilidad capilar (bioflavonoides del género Citrus: rutina y derivados) dilatadores de las coronarias (proantocianidinas de Crataegus, Árnica y Ginkgo), espasmolítica (glicósidos de apigenina), antihepatotóxica (silimarina de Silybum), colerética, estrogénica y diurética.

Los flavonoides se encuentran principalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos y los más comunes son las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. (DOMINGUEZ, S., XORGE, A. 1993)

a) Características físico químicas de los flavonoides

Los flavonoides presentan diferentes grados de solubilidad: agua, etanol, metanol (compuestos con grupo hidroxilo libres y glicósidos), acetato de etilo, cloroformo, éter etílico (agliconas esterificadas); se caracterizan por su carácter fenólico y debido a que contienen un sistema aromático conjugado muestran una intensa absorción de bandas en el espectro UV/VIS, lo cual nos permite realizar un estudio cualitativo y cuantitativo de estos compuestos. (DOMINGUEZ, S., XORGE, A. 1993)

b) Características biológicas de los flavonoides

Los flavonoides actúan como antioxidantes, y se definen como sustancias que, a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato.

La importancia de un antioxidante depende de su concentración, del medio donde actúa y de su habilidad para interactuar con sistemas regeneradores. (SERRA-BALDRICH, E. 1991)

c) Espectros de flavonoides

Los espectros de absorción consisten en dos máximos de absorción en los rangos de 240 – 285 nm (banda II), y 300 – 550 nm (Banda I). Podría indicarse como características de dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavononas.

CUADRO No. 5 ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LOS FLAVONOIDES.

FUENTE: LOCK, O. 1994

BANDA II, nm	BANDA I, nm	TIPO DE FLAVONOIDE
250-280	310-350	Flavonas
250-280	330-360	Flavonoles (3OH Substituido)
250-280	350-385	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxo)
275-295	300-330	Isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270 (baja intensidad)	340-390	Chalconas
230-270 baja intensidad)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas, antocianinas

d) Clasificación de los flavonoides

En función a su característica estructural se pueden clasificar en: flavonas como la catequina, flavonoles representados por la quercetina, flavonas como la diosmetina y las antocianidinas.

En cuanto a sus efectos fotoprotectores, los flavonoides de un lado absorben la radiación UV, de otro poseen actividad antioxidante directa e indirecta y, por último, modulan diversas vías de señalización.

Se han identificado más de 5.000 flavonoides, que poseen algún efecto fotoprotector, ya sea en mayor o menor proporción. (LOCK, O. 1994)

e) Efecto fotoprotector de la quercetina

La quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiflavona) pertenece al grupo de los flavonoides, es una flavona natural producida por algunas especies de vegetales. Se caracteriza por tener en su estructura un grupo difenilpropano.

La quercetina es sólido a temperatura ambiente y en el espectro visible posee color amarillo y dos fuertes bandas de absorbancia en el ultravioleta, las mismas que son: 256nm y 368nm. (FAHLMAN, B. 2010).

Estos compuestos son conocidos por sus propiedades fotoprotectoras UVB en plantas. Las plantas en distintos compartimentos celulares y en diferentes estructuras de tejidos, acumulan pigmentos, tales como flavonoides, que pueden disminuir la radiación en el UV y las partes visibles del espectro.

Los flavonoides poseen la capacidad de eliminar los radicales libres y especies de oxígeno reactivas. Ya que poseen en su estructura los grupos hidroxifenólicos, los flavonoides pueden donar átomos de hidrógeno a los radicales, actuando así como terminadores de cadena de los radicales.

Captan radicales involucrados en el envejecimiento cutáneo y por lo tanto poseen efectos beneficiosos en los seres humanos, en los que han sido probados para contrarrestar el envejecimiento, la inflamación, la aterosclerosis y el cáncer. . (DALLACQUA, S. y otros. 2012).

Según estudios realizados demuestran que la quercetina posee efecto fotoprotector al ser incorporado en una emulsión agua/aceite, se tiene el 1 a 2 de PSF. Y al ser combinado con dióxido de titanio se obtuvo el 30 de FPS. (CHOQUENET, B. 2008)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en el laboratorio de Productos Naturales, en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Bioquímica y Farmacia

Y en el Laboratorio de microbiología de la Escuela de Biotecnología Ambiental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 MUESTRAS, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MUESTRAS

La muestra de Aliso (*Alnus acuminata*), fue recolectada en las proximidades de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2.2 EQUIPOS

Refrigeradora (DUREX)

Autoclave (TUTTNAUER 2540 MK)

Cámara de flujo laminar

Estufa

Bomba de vacío

Sorbona

Balanza analítica (ADAM Y BOECO)

Ph metro (HANNA INSTRUMENT Y HANNA WATERPROOF)

Espectrofotómetro (THERMO)

Mufla (VULCAN Y SNOL)

Cámara fotográfica (SONY)

Lámpara UV

Centrifuga (CLAY ADAMS)

2.2.3 REACTIVOS

- Hexano GR (FISHER SCIENTIFIC)
- Tricloruro de aluminio al 10 %
- Éter etílico
- Quercetina
- Acetato de etilo (FISHER SCIENTIFIC)
- Reactivo de Dragendorff
- Etanol al 96%
- Reactivo de Mayer
- Acido clorhídrico
- Reactivo de Wagner
- Acido fórmico
- Solución de Fehling
- Agua destilada
- Reactivo de Baljet
- Acido sulfúrico
- Reactivo de Sudan III
- Cloroformo
- Tricloruro férrico
- Anhídrido acético
- Alcohol amílico
- Metanol absoluto
- TLC Silica gel 60 F 254
- Caldo soya tríptica
- Agar base
- Agua de peptona

2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.3.1 MUESTRAS

La muestra de aliso (*Alnus acuminata*), fue recolectada en las proximidades de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a una altitud de 2750 m.s.n.m.

2.3.1.1 Procesamiento de materia prima: limpieza y desinfección del material vegetal

Se recolectó las hojas de aliso (*Alnus acuminata*) en fundas con cierre hermético.

Se lavó las hojas con agua, se dejó secar al ambiente y en un lugar oscuro.

2.3.2 ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL ALISO (*Alnus acuminata*), COMO DROGA SECA

Se aplicó el análisis físico químico de la materia seca, según las especificaciones de la Real Farmacopea Española 2002 para productos naturales, en base a los siguientes parámetros.

2.3.2.1 Determinación de humedad

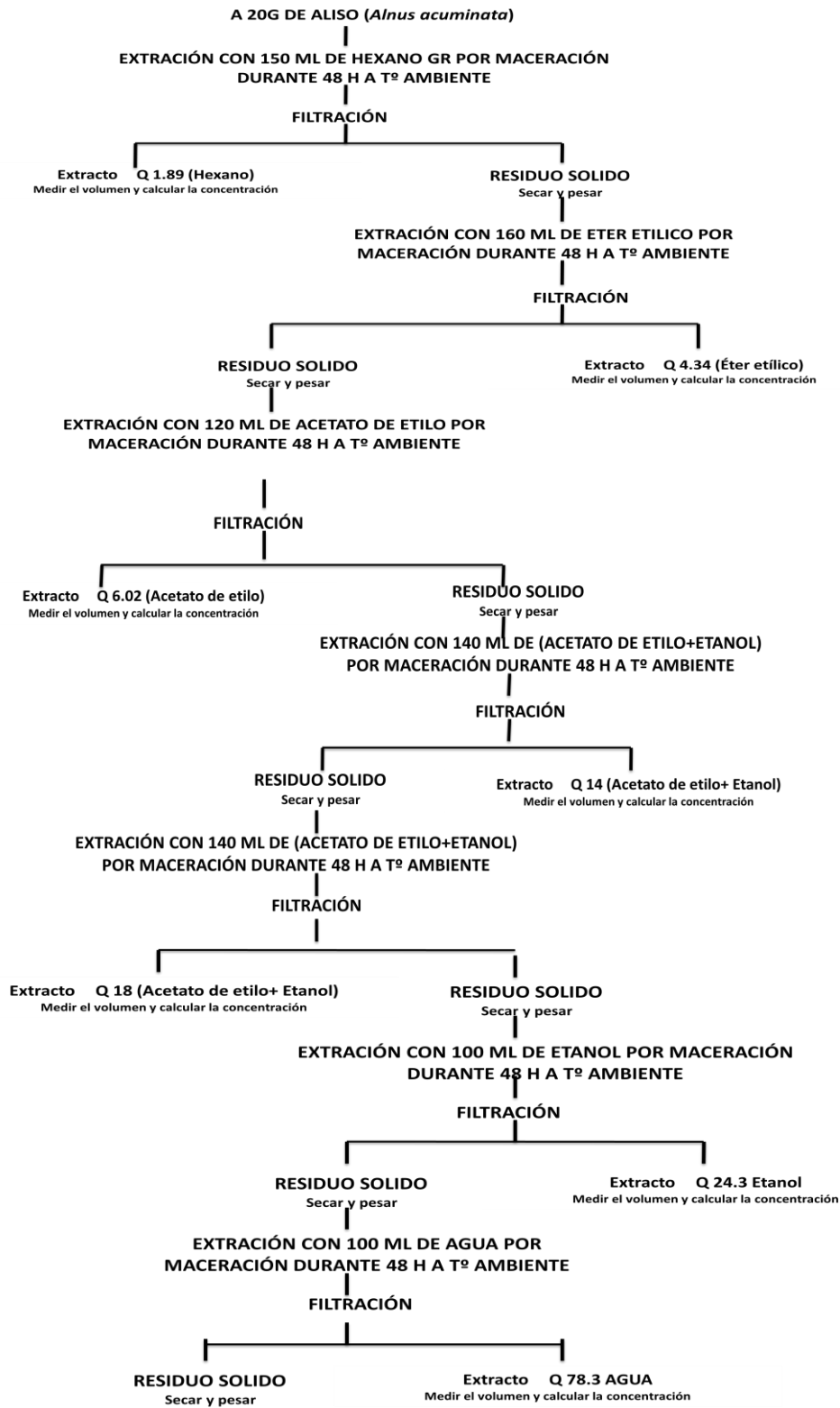
2.3.2.2 Determinación de cenizas totales (Método de incineración en mufla)

2.3.2.3 Determinación de cenizas solubles en agua

2.3.2.4 Determinación de cenizas solubles en ácido clorhídrico.

2.3.3 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se realizaron varios extractos fraccionados con diferentes constantes dieléctricas (Q), los mismos que fueron representados de acuerdo a la constante dieléctrica que posee cada uno de los solventes: Q 1.89 (hexano), Q 4.34 (éter etílico), Q 6.02 acetato de etilo, Q 14 mezcla de acetato de etilo + etanol, Q 18 mezcla de acetato de etilo + etanol, Q 24.3 (etanol) y Q 78.3 (agua).



2.3.4 DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS EXTRACTOS FRACCIONADOS

Se aplicó las técnicas establecidas por MIRANDA, M. 2000.

2.3.5 SCREENING FITOQUÍMICO

CUADRO No. 6 PROCEDIMIENTO PARA EL SCREENING FITOQUÍMICO

Ensayo	Metabolito	Reactivo	Resultados
Sudan III	Aceites y grasas	Sudan III	Positivo si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayo
Dragendorff	Alcaloides	Reactivo Dragendorff	Positivo si hay Opalescencia (+); Turbidez (++); Precipitado (+++).
Mayer		Reactivo Mayer	Positivo: blanco a crema, Opalescencia (+); Turbidez (++); Precipitado (+++).
Wagner		Reactivo Wagner	Positivo: color marrón, Opalescencia (+); Turbidez (++); Precipitado (+++).
Baljet	Lactonas y cumarinas	Reactivo Baljet	Positivo cuando hay coloración o precipitado rojo
Shinoda	Flavonoides	Agregar un trozo pequeño de cinta de magnesio y luego	Positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo,

		gotas de Acido Clorhídrico concentrado, después de esperar 5 minutos, se añade 1ml de alcohol amílico	naranja o rojo
FeCl ₃	Taninos	Añadir acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5%	Positivo cuando la coloración es verde intenso o azul
Borntrager	Quinonas	Adicionar 1 ml de hidróxido de sodio al 5%.	Coloración rosada (++) , y roja (+++).
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	Adicionar 1 ml de anhídrido acético y resbalar 2 a 3 gotas de acido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo.	Rosado- azul muy rápido; verde intenso- visible aunque rápido, verde oscuro- negro final de la reacción.
Fehling	Azucares reductores	Reactivo de Fehling	Positivo si se colorea de rojo.
Antocianidinas	C ₆ C ₃ C ₆ de los flavonoides.	Calentar 10 ml de extracto con 1 ml de HCL, enfriar y adicionar 1 ml de agua y 2ml de alcohol amílico.	Positivo cuando la fase amílica se colorea de rojo a marrón.
Mucilagos	Mucilagos	Enfriar a 0-5°C.	Positivo cuando toma la consistencia de gelatina
Principios amargos y	Principios amargos y	Saborear una gota de extracto acuoso.	Saboreando la muestra.

astringentes.	astringentes.		
Espuma	Saponinas	Agitar fuertemente durante 5-10 minutos.	Positivo con la aparición de espuma.

FUENTE: MIRANDA, M. 2000

2.3.6 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Los extractos fraccionados de aliso (*Alnus acuminata*) fueron evaporados a sequedad y reconstituidos en metanol absoluto hasta obtener una concentración de 20 ppm (partes por millón).

Para la determinación de flavonoides se realizó un barrido en el espectrofotómetro, a una λ de 200 a 400 nm. (LOCK, O. 1994)

2.3.7 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Para evaluar la presencia de compuestos fenólicos se realizó la cromatografía en capa fina (TLC), utilizando placas de silica gel de 2 cm x 10 cm, en donde se utilizaron solventes específicos.

El primer sistema de corrido se probó con Tolueno: Acetato de etilo en una proporción de (9:1) y se rebeló con Sulfato de Cerio en donde se obtuvieron manchas coloreadas y redondas, para comprobar la presencia de flavonoides en los extractos Q 1.89 (hexano), Q 4.34 (éter etílico), Q 6.02 (acetato de etilo), Q 14.0 (acetato de etilo + etanol), Q 18.0 (acetato de etilo + etanol).

En los extractos Q 24.3 (etanol) y Q 78.3 (agua), se probó con Acetato de etilo: Metanol: Agua en una proporción de (25: 3.4: 2.5), revelado con Sulfato de Cerio en donde aparecieron manchas redondeadas y con color. (WAGNER, H.1996)

En el extracto Q 6.02 (acetato de etilo) se determinó la presencia de ácido ferúlico y se corrió con Tolueno: Acetato de etilo: formaldehido en una proporción de (6:3:1) y se

rebeló con luz UV. Siendo comparado el valor de Rf con datos en bibliografía. SHARAD, S. 2012.

Para determinar el Rf se aplica la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

2.3.8 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA

FUNDAMENTO

El análisis de flavonoides por cromatografía permite identificar a ciertos compuestos utilizados como estándar, como es el caso de la quercetina, que reacciona positivamente ante reveladores clásicos. Los valores de flavonoides totales son expresados en valores de mg de flavonoides empleado como estándar equivalente por gramo de muestra.

MÉTODO

El extracto Q 6.02 (acetato de etilo) se evaporó a sequedad y se reconstituyó con 30 ml de metanol absoluto.

En una placa de TLC Silica gel de 20 x 10 cm, se corrió la fase móvil con tolueno: metanol: ácido fórmico: agua en una proporción de (0.63; 12.5; 1.25; 1.25). Se reveló una parte de la placa con Sulfato de Cerio (0.3 g de sulfato de cerio + 65 ml de H₂SO₄ y 35ml de H₂O), y se comparó con el estándar de la quercetina.

El componente de parecido Rf al del estándar fue raspado y se colocó en un tubo (previamente tarado), la silica gel coloreada se lavó con metanol absoluto durante

algunas veces y se filtró con un algodón, hasta que la silica gel tome una coloración blanca característico de la silica gel.

La silica gel se dejó secar al ambiente y se pesó siendo este el estándar de quercetina propio de la planta.

Al filtrado se le realizó un barrido espectral en el espectrofotómetro a una λ de 200 nm a 400 nm.

A la máxima λ obtenida se leyeron los extractos.

Para la cuantificación de flavonoides totales se realizó la fórmula:

$$x = \frac{m \times Pr \times 5}{Ar}$$

X = Contenido de flavonoides %

Am= Absorbancia de la muestra (nm)

Pr= Peso de la sustancia de referencia (g)

Ar= Absorbancia de la sustancia de referencia (nm)

2.3.9 ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA Y FPS IN VITRO

2.3.9.1 Fotoprotección

Los métodos in vitro tienen la finalidad de evitar el daño de células por lo que se determinó la capacidad de sobrevivir las bacterias en determinadas condiciones, como es el caso de la exposición a la luz ultravioleta durante un periodo de tiempo determinado y con o sin protección.

Se empleó la bacteria *E coli.*, por su capacidad que poseen las bacterias de sobrevivir en determinadas condiciones, ya que toleran temperaturas hasta de 42 °C, además pueden ser aeróbicas o anaeróbicas facultativas, los requerimientos de nutrientes en el

metabolismo de los miembros de esta familia no son altamente exigentes y crecen de manera muy similar, cualquiera de sus especies, en la mayoría de los medios que se utilicen, por lo general, un agar nutriente, agar-sangre, agar-sangre-chocolate o caldo nutritivo.

Descripción de la bacteria

CUADRO No. 7 *Escherichia coli* ATCC25922

Clasificación científica	
Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>E. coli</i> ((<i>E. freundii</i>))

FUENTE: GRANADOS, R. 2003

Morfología

Las enterobacterias son bacilos gran negativos que, en ocasiones, en cultivos jóvenes, se pueden observar formas cocobacilares y hasta cocoides. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0,5 y 2 um de ancho, y de 2 a 4um de largo. La presencia de una cápsula puede ser observada muy rara vez en algunas cepas de *E. coli*.

La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* toleran temperaturas hasta de 42 °C. De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno pueden ser aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Los requerimientos de nutrientes en el metabolismo de los miembros de esta

familia no son altamente exigentes y crecen de manera muy similar, cualquiera de sus especies. (KONEMAN, E. 2004)

2.3.9.2 Factor de protección solar

Los métodos in vitro miden la absorción o la transmisión de la radiación ultravioleta a través de protector solar en placas de cuarzo.

Se empleó una fuente de luz que emite una radiación comprendida entre 290 -320 nm correspondiente a la UVB y la medición se realiza empleando el espectrofotómetro, el mismo que mide la intensidad de la radiación y además detecta la longitud de onda alcanzada por los componentes cromóforos.

La absorbancia es aproximadamente la inversa de la transmitancia de una longitud de onda dada.

Los resultados obtenidos in vitro son validados con los obtenidos empleando los métodos in vivo. (SORDO, C. 2010).

2.3.10 EFECTO FOTOPROTECTOR POR MUERTE CELULAR EN *Escherichia coli* INDUCIDO POR RAYOS UVB.

Obtención de los extractos

Se preparó diluciones hasta obtener una concentración al 1% (p/v), de fotoprotección se utilizó 0.1 ml de los extractos de Q6.02 (acetato de etilo), Q14 (acetato de etilo + etanol y Q78.3 (agua), fueron evaporados a sequedad y redisolventes con 0.5 ml de metanol absoluto.



FOTOGRAFIA No. 2 EXTRACTOS Q 6.02 (ACETATO DE ETILO), Q14 (ACETATO DE ETILO + ETANOL Y 78.3 (AGUA)).
FUENTE: BUENAÑO, Y. 2014.

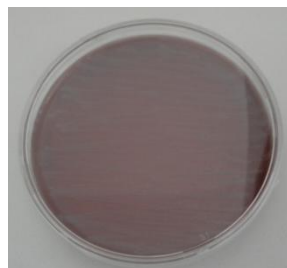
Siembra, cultivo y conservación de *Escherichia coli*

La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue proporcionada por el laboratorio de microbiología clínica de la escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



FOTOGRAFIA No. 3 CEPA DE *E. coli* ATCC 25922
FUENTE: BUENAÑO, Y. 2014.

Para la conservación y reactivación de la bacteria se sembró en agar sangre y se incubó a 35 ± 0.5 °C durante no más de 18 horas, para tener un cultivo en fase estacionaria temprana.



FOTOGRAFIA No. 4 SIEMBRA DE *E. coli* EN AGAR SANGRE
FUENTE: BUENAÑO, Y. 2014.

Se preparó una caja de agar base en donde se pesó 0.35 g de agar base en 15 ml de agua destilada y se esterilizó en el autoclave por 15 minutos a 120 Kg/cm^2 , y se dejó enfriar. Se recogió muestra de bacteria con una asa de platino y se sembró en la caja por estriamiento, se incubó a 37°C durante 14 horas.

Inoculación de la bacteria *Escherichia coli*

Se preparó 6 tubos con caldo soya tríptica

La cepa de la bacteria ATCC 25922 fue inoculada en seis tubos con caldo soya tríptica con la ayuda de un hisopo estéril, comparándole la turbidez con el estándar Mc Farland hasta alcanzar una turbidez de 1.5×10^7 células/ ml o 1.5×10^8 células/ ml, debajo de una hoja de papel negra con líneas blancas.

La bacteria fue centrifugada durante 20 minutos a 3000 Rev. /min, y se desechó el sobrenadante.

La bacteria fue suspendida en 10 ml de agua de peptona para obtener un pH de 7, además se colocó cada sustancia fotoprotectora previamente disuelta en metanol (2mg/ml) y fue transferida a tubos de cuarzo. Para que permitan el paso de la radiación UV.

Cada uno de los tubos fue irradiado por la lámpara UV (312 nm), durante 30 minutos.

Posteriormente se hicieron diluciones de los tubos irradiados tomando una alícuota de 20 μ l y fueron suspendidos en 10 ml de agua estéril.

Una vez homogenizada la muestra se tomó 100 μ l, fue vertida en placas estériles y se agregó de 12 a 15 ml del medio de cultivo agar base, mezclándolo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio, y fueron colocados en la estufa a 37°C durante 14 horas para realizar el conteo de las UFC /ml.

Las sustancias empleadas fueron los extracto Q 6.02 (acetato de etilo), Q 14 (acetato de etilo + etanol) y el Q 72 (agua).

El control positivo fue el Acido Para Amino Benzoico (PABA), el control negativo fue el solvente usado para disolver las sustancias fotoprotectoras, es decir, metanol absoluto y el blanco las bacterias suspendidas en agua de peptona sin irradiar. (Ávila J. y otros 2005).

CUADRO No. 8 MUESTRAS DE EXPERIMENTACIÓN

GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	MUESTRAS	TIPO DE RADIACIÓN
BLANCO	Bacterias	Sin irradiar
POSITIVO	Ácido Para Amino Benzoico (PABA)	Irradiado por la lámpara UV (312 nm)
NEGATIVO	Metanol	Irradiado por la lámpara UV (312 nm)
EXTRACTO 1	Extracto Q 6.02 (acetato de etilo)	Irradiado por la lámpara UV (312 nm)
EXTRACTO 2	Extracto Q 14 (acetato de etilo + etanol)	Irradiado por la lámpara UV (312 nm)
EXTRACTO 3	Extracto Q 72 (agua).	Irradiado por la lámpara UV (312 nm)

FUENTE: BUENAÑO, Y. 2014.

Para realizar el conteo se dividió las cajas petri en cuatro cuadrantes para obtener los valores de la UFC/ml. (ÁVILA J. y otros. 2005).



FOTOGRAFIA No. 5 SIEMBRA DE *E. coli* EN AGAR BASE
FUENTE: BUENAÑO, Y. 2014.

2.3.11 FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FSP) POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN LA LUZ UVB

A 0.1 ml de los extractos Q 6.02 (acetato de etilo), Q 14 (acetato de etilo + etanol) y el Q 72 (agua) se adicionó 5 ml de metanol absoluto y el control positivo (PABA) se pesó 1g y se disolvió en 5 ml de metanol absoluto hasta obtener en todos los casos una concentración de 20 ppm.

Los espectros de absorción de la muestra fueron obtenidos en la gama de 290-450 nm colocados en una cubeta de cuarzo y utilizando como blanco metanol absoluto.

Los datos de absorción fueron obtenidos en el espectrofotómetro, en un rango de 290 a 320 nm cada 5 nm y se realizaron 3 medidas en cada punto y el cálculo mediante la aplicación de la ecuación de Mansur. (ABREU E. y otros. 2004)

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

En donde:

SPF = Factor de Protección Solar

CF(λ)= Factor de Correlación 10 (está determinado por el estándar de las formulaciones de fotoprotección que contienen el 8% determinado por espectrofotometría UV.

MANSUR, J. y otros. 1986

EE(λ)= Espectro Eritemal

I (λ)= Espectro de intensidad solar

Abs(λ) = Absorvancia de la sustancia fotoprotectora

EE x I = Son constantes determinadas por SAYRE, R. y otros.1979

TABLA No. 2 VALORES NORMALIZADOS UTILIZADOS PARA EL CÁLCULO DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR

Longitud de onda (λ)	Valor normalizado de EE x I
290	0.0150
295	0.0817

300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180

Fuente: Sayre, J. y otros. 1979

CAPITULO III

3. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se aplicó el análisis físico químico de la materia seca, según las especificaciones de la Real Farmacopea Española 2002.

3.1 ANALISIS FÍSICO QUÍMICO DEL DE ALISO (*Alnus acuminata*), COMO DROGA SECA

TABLA No. 3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL ALISO (*Alnus acuminata*), COMO DROGA SECA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH, JULIO DEL 2014.

PARAMETRO	PORCENTAJE (%)	Especificación (Farmacopea Española 2002)
Contenido de Humedad	9.22 ± 0.06	14
Contenido de Cenizas totales	5.94 ± 0.54	≤ 12 %
Contenido de Cenizas solubles en agua	3.68 ± 0.08	≤ 7 %
Contenido de Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	1.75 ± 0.64	≤ 5 %

Los requisitos físico químicos del aliso cumplen con las especificaciones de la Real Farmacopea Española del 2002.

3.2 ELABORACIÓN DE EXTRACTOS FRACCIONADOS CON DISTINTA POLARIDAD

TABLA No. 4 DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS EXTRACTOS FRACCIONADOS OBTENIDOS CON DISTINTA POLARIDAD. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.

Extractos fraccionados	Constante dieléctrica (Q) A 25°C	pH
Hexano	1.89	6.69
Éter etílico	4.34	6.18
Acetato de etilo	6.02	3.99
Acetato de etilo + etanol	14.0	5.45
Acetato de etilo + etanol	18.0	5.46
Etanol	24.3	6.06
Agua	78.3	4.16

Se obtuvieron extractos fraccionados con distinta polaridad, con la finalidad de determinar los metabolitos secundarios que presentan mayor actividad fotoprotectora.

Se usó hexano y éter para eliminar grasas y ceras; acetato de etilo, la mezcla de acetato de etilo y etanol a una constante dieléctrica de 14 y 18 para obtener compuestos mediamente polares, el etanol y el agua para obtener los metabolitos mas polares del vegetal.

El pH del extractos del aliso (*Alnus acuminata*) fueron ácidos, principalmente el Q6.02 (acetato de etilo), posiblemente por la mayor presencia de ácidos orgánicos como el ácido ferúlico.

3.4 SCREENING FITOQUÍMICO

Se realizó el análisis fitoquímico para identificar los metabolitos secundarios que componen el aliso (*Alnus acuminata*).

CUADRO No. 9 RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS Y SUB-EXTRACTOS CON DIFERENTE Q (CONSTANTE DIELECTRICA). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH, JULIO DEL 2014.

ENSAYO	METABOLITO	EXTRACTOS Y SUB-EXTRACTOS						
		Q 1.89	Q 4.34	Q 6.02	Q 14.0	Q 18	Q 24.3	Q 78.3
Sudan III	Aceites y grasas		+	+	+	+		
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Mayer	Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Baljet	Lactonas y cumarinas	-	-	-	-	-	++	
L-B	triterpenos y/o esteroides	++	-	-	+	++	+++	
Shinoda	Flavonoides	+	+	+++	+	+++	+	++
Resinas	Resinas						-	
Fehling	Azucares reductores						+++	++
FeCl₃	Taninos						+++	+++
Borntrager	Quinonas						+++	
Antocianidina	Flavonoides						-	
Espuma	Saponinas						-	-
Mucilagos	Mucilagos							-
Principios amargos								++

Fuente: BUENANO, Y. 2014

INTERPRETACION:

-	AUSENCIA
+	BAJA EVIDENCIA
++	EVIDENCIA
+++	ALTA EVIDENCIA

Según los datos del cuadro No. 9, se observa que en los extractos hay alta evidencia de triterpenos, flavonoides, azúcares reductores, taninos y quinonas.

En menor proporción se evidenció la presencia de lactonas, cumarinas y grasas.

Estos datos están en concordancia con los datos bibliográficos obtenidos en el tamizaje fitoquímico de aliso (*Alnus acuminata*) por SÁNCHEZ, I. y otros. (2012) y SALAMA, A. y otros (1989).

3.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Barrido Espectral UV-VIS de flavonoides

Con la finalidad de determinar los máximos de absorción en el espectrofotómetro en el UVB, se realizó un barrido a una longitud de onda de 200 a 400 nm de los extractos fraccionados.

CUADRO No. 10 BARRIDO ESPECTRAL DE LOS EXTRACTOS Q 1.89, Q 4.34, Q 6.02, Q 14.0, Q 18.0, Q 24.3 Y Q 78.3 DE LA MUESTRA DE ALISO (*Alnus acuminata*). LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH, JULIO DEL 2014.

Q 1.89 (HEXANO)	Q 4.34 (ÉTER ETÍLICO)	Q 6.02 (ACETATO DE ETILO)
Q 14.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	Q 18.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	Q 24.3 (ETANOL)
Q 78.3 (AGUA)		

En el barrido espectral se determinó que los extractos que presentan mayor absorción a longitudes de onda entre 200 a 400 nm fueron los sub-extractos Q 6.02 (acetato de etilo), Q 14.0 (acetato de etilo + etanol), y Q 78.3 (agua) presentando los siguientes picos y absorbancias.

TABLA No. 5 RESULTADOS DEL ESPECTRO A UNA LONGITUD DE ONDA DE 200 A 400 nm. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH, JULIO DEL 2014.

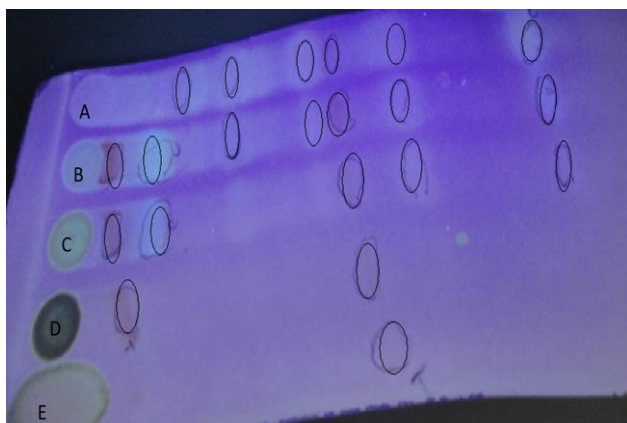
COMPUESTO	UV PRÁCTICO	ABSORBANCIA	UV TEÓRICO	POSIBLE COMPUESTO
Q 6.02 (ACETATO DE ETILO)	214	0.233		
	223	0.241		
	229	0.226		
	237	0.228	230-270	Chalconas
	267	0.342	250-280	Flavonas
	360	0.223	250-280	Flavonoles
Q 14.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	231	0.832	230-270	Chalconas
	241	0.842	230-270	Chalconas
	259	1.451	250-280	Flavonas
	270	1.471	230-270	Chalconas
	282	1.434	275-295	Isoflavona
	346	1.093	330-360	Flavonol
Q 18.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	215	0.474		
	228	0.498		
	233	0.493	230-270	Chalconas
	259	0.749	250-280	Flavonas
	269	0.748	230-270	Chalconas
	346	0.544	330-360	Flavonol
Q 78.3 (AGUA)	216	3.968		
	224	4.008		
	268	2.268	250-280	Flavona
	285	2.345	275-295	Isoflavona
	322	2.101	330-360	Flavonol

Fuente: Lock O. 1994

Se determinó espectroscópicamente que el extracto Q 6.02 (acetato de etilo), Q 14.0 (acetato de etilo + etanol), Q 18.0 (acetato de etilo + etanol) y Q 78.3 (agua) tienen en su estructura flavonoles, flavonas e isoflavonas. En donde la mezcla 18 posee los mismos picos que la mezcla 14. Y comparado con estudios realizados en aliso (*Alnus acuminata*) por SALAMA, A. y otros. 1989, se demostró la presencia de los componentes.

3.6 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

FOTOGRAFIA No. 6 PLACA PREPARATIVA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN LOS EXTRACTOS Q 1.89 (HEXANO), Q 4.34 (ÉTER ETÍLICO); Q 6.02 (ACETATO DE ETILO); Q 18.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL) Y Q 24.3 (ETANOL)



Fase estacionaria: Silica gel

Solvente de recorrido: Tolueno-Acetato de etilo (9:1)

Revelador: Sulfato de cerio

Interpretación: **A** Extracto Q 1.89 (Hexano); **B** extracto Q 4.34 (Éter etílico); **C** extracto Q 6.02 (Acetato de etilo); **D** extracto Q 18.0 (Acetato de etilo + etanol); **E** extracto Q 24.3 (Etanol)

FOTOGRAFIA No. 7 PLACA PREPARATIVA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN EL EXTRACTO Q 14.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)



Fase estacionaria: Silica gel

Solvente de recorrido: Acetato de etilo – Metanol- Agua (25:3.4:2.5)

Revelador: Sulfato de cerio

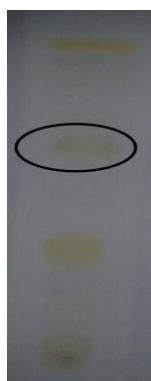
INTERPRETACIÓN: F extracto Q 14.0 (Acetato de etilo + etanol)

TABLA No. 6 VALORES DE RF OBTENIDOS A PARTIR DE LA CROMATOGRAFÍA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH, JULIO DEL 2014.

	EXTRACTO Y SUEXTRACTOS	RF prácticos
A	Q 1.89 (HEXANO)	RF1= 0.22 RF2= 0.34 RF3= 0.38 RF4= 0.48 RF5= 0.68 RF6=0.70
B	Q 4.34 (ETER ETILICO)	RF1= 0.04 RF2= 0.11 RF3= 0.23 RF4= 0.38 RF5= 0.48 RF6=0.70 RF7=0.80
C	Q 6.02 (ACETATO DE ETILO)	RF1= 0.05 RF2= 0.11 RF3= 0.38 RF4= 0.48 RF5= 0.70
D	Q 18.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	RF1= 0.17 RF2= 0.48
E	Q 24.3 (ETANOL)	RF1= 0.15 RF2= 0.33
F	Q 14.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	RF1= 0.08 RF2= 0.48 RF3= 0.97

En las cromatografías en capa fina el valor de Rf que presentó con mayor frecuencia es el Rf 0.48 siendo el estándar utilizado para los flavonoides y el color a la radiación UV son tomados característicos de flavonoides y flavonas según Wagner 2006, lo que posiblemente representa el valor del Rf de la Quercetina según estudios realizados por GUERRERO, D. 2014, que fue de 0.43.

FOTOGRAFIA No. 8 CROMATOGRAFÍA PARA EL ACIDO FERÚLICO



Muestra: Q 6.02 (Acetato de etilo)

Fase estacionaria: Silica gel

Solvente de recorrido: Tolueno: Acetato de etilo: formaldehído (6:3:1)

Revelador: luz UV

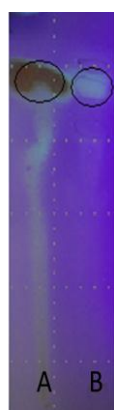
En las cromatografías en capa fina el valor de Rf fue de 0.63 comparado con el Rf de SHARAD, S. en el 2012 que fue de 0.61 y al ser revelado en la luz UV presentó un color naranja característico de compuestos fenólicos.

3.7 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA

3.7.1 PLACA PREPARATIVA PARA LA PURIFICACIÓN DE QUERCETINA

FOTOGRAFIA No. 9 TLC PARA LA PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS

Fase estacionaria: Silica gel



Muestra: Extracto Q 6.02 acetato de etilo

Solvente de recorrido: Tolueno- Metanol-Acido fórmico- Agua (9:1)

Revelador: Sulfato de cerio

INTERPRETACION:

A Quercetina;

B Sub-extracto Q 6.02 (Acetato De Etilo)

TABLA No. 7 COMPARACIÓN DE LOS Rf PARA LA QUERCETINA Y EL EXTRACTO Q 6.02 ACETATO DE ETILO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. ESPOCH. JULIO 2014.

Compuesto	Rf
Quercetina	0.9
Extracto Q 6.02 Acetato De Etilo	0.9

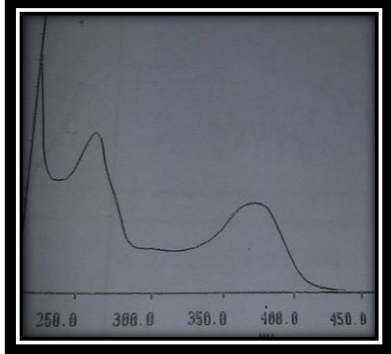
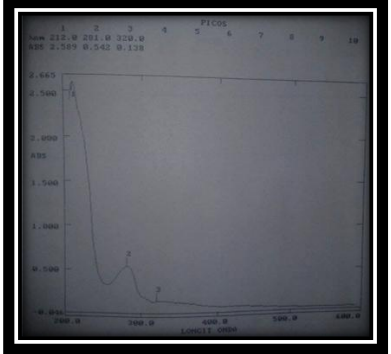
Según estudios realizados por KUMAR, A. en el 2010 demuestran que el Rf de la Quercetina es 0.9, y comparando con el Rf práctico del sub-extracto Q 6.02 (acetato de etilo) que fue de 0.9 se comprueba que se trata del mismo compuesto.

3.7.2 PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS

El compuesto que se aisló fue la quercetina que presentó un Rf 0.90, comparado con el estándar de la quercetina que su valor de Rf fue el mismo.

3.7.3 BARRIDO ESPECTRAL DE LA CROMATOGRAFÍA DEL SUB-EXTRACTO Q 6.02 (ACETATO DE ETILO), A UNA LONGITUD DE ONDA DE 200 A 600 nm.

CUADRO No. 11 COMPARACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LA QUERCETINA Y EL DEL SUB-EXTRACTO 6.02 (ACETATO DE ETILO). LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.

COMPUESTO	Quercetina	Sub-extracto Q 6.02 (Acetato de etilo)
ESPECTRO DE ABSORCION		
LONGITUD DE ONDA	232, 279, 314 nm	212, 281, 320 nm

En el barrido espectral de 200 a 600 nm en el espectrofotómetro, se comprobó la presencia de quercetina en el extracto Q 6.02 (acetato de etilo) presentando tres picos de absorción a 212.0 nm, 281.0 nm y 320.0 nm que al ser comparados con los estudios realizados por LOCK, O. 1994 son similares.

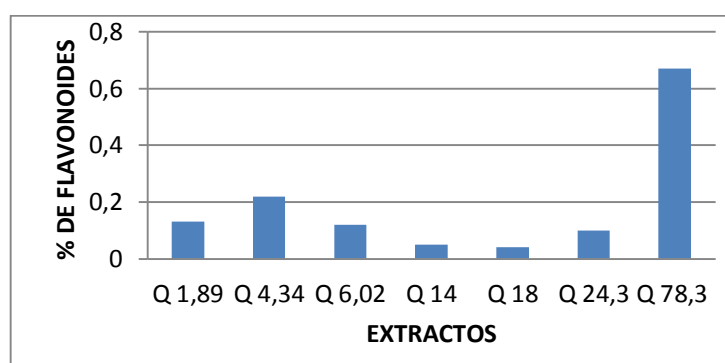
TABLA No. 8 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE QUERCETINA A UNA LONGITUD DE ONDA DE 200 A 400 nm. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.

Extractos	λ (nm)	Absorbancias	Flavonoides (%)
Q 1.89 (Hexano)	281 nm	0,419	0,123303506
Q 4.34 (Éter etílico)	281 nm	0,733	0,215805658
Q 6.02 (Acetato de etilo)	281 nm	0,422	0,124186347
Q 14.0 (Acetato de etilo + Etanol)	281 nm	0,184	0,054343788

Q 18.0 (Acetato de etilo + Etanol)	281 nm	0,144	0,042572571
Q 24.3 (Etanol)	281 nm	0,349	0,102703875
Q 78.3 (Agua)	281 nm	2,276	0,669782288
			1,332698032

El porcentaje de flavonoides en el aliso (*Alnus acuminata*) es de 1.33% \pm 0.22 en base a quercetina.

GRÁFICO No. 1 PORCENTAJE DE FLAVONOIDES OBTENIDOS EN CADA EXTRACTO DE ALISO (*Alnus acuminata*). LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.



Como se observa en el Gráfico No. 1, el extracto con mayor contenido de flavonoides es el Q 78.3 (agua) en comparación con los demás ya que presenta flavonoides de forma glicosidada.

3.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOPROTECTOR POR MUERTE CELULAR EN *Escherichia coli* INDUCIDO POR RAYOS UVB.

En los resultados obtenidos de fotoprotección mediante el test de muerte celular en *E. coli* inducido por rayos UVB, se observó un mayor número de colonias de bacterias sobrevivientes en el blanco que no se irradió y a continuación el extracto Q 6.02 (acetato de etilo) que fue expuesto a la radiación en la lámpara UV.

TABLA No. 9 RESULTADO DE EFECTO FOTOPROTECTOR EN *E. coli* AL EXPONER A LA RADIACIÓN UV. LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.

MUESTRAS	\bar{x} (UFC)
BLANCO	$3,8 \times 10^7 \pm 0.35$
POSITIVO (PABA)	$2,0 \times 10^7 \pm 0.1$
NEGATIVO	$3,2 \times 10^7 \pm 0.35$
EXTRACTO Q 6.02 (Acetato de etilo)	$3,6 \times 10^7 \pm 0.25$
EXTRACTO Q 14 (Acetato de etilo + Etanol absoluto)	$3,2 \times 10^7 \pm 0.3$
EXTRACTO Q 78.3 (Agua)	$1,6 \times 10^7 \pm 0.3$

El efecto fotoprotector UVB inducido por muerte celular a la bacteria *Escherichia coli* ATCC. 25922, demuestra que el extracto Q 6.02 (acetato de etilo), posee la mayor actividad fotoprotectora comparada con el blanco (células sin irradiar), con el control positivo (PABA), y el control negativo (etanol). Siendo así que los componentes del sub-extracto Q 6.02 (acetato de etilo), poseen la actividad fotoprotectora ya que la población de bacterias fue de $3.06 \times 10^7 \pm 0.25 \text{ cell/ml}$ después de ser sometidas 30 min a radiación UV, en relación con el estándar Mac Farland que fue de $1.5 \times 10^7 \text{ cell/ml}$.

Según estudios realizados por BUSSMANN R. y otros. En el 2010 en aliso (*Alnus acuminata*), demuestra que el vegetal presenta actividad bacteriana, por lo que los resultados obtenidos tienen actividad fotoprotectora.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

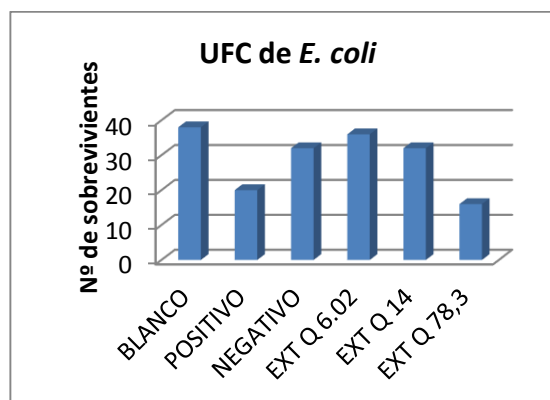
En el estudio del efecto fotoprotector con *Escherichia coli* mediante irradiación a las bacterias durante 30 minutos fue evaluado con el test ANOVA de un factor al 95% de confianza obteniéndose que p es 0.0004^{-2} por lo tanto se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa.

TABLA No. 10 PRUEBA DE TUKEY AL 5% DE BACTERIAS SOBREVIVIENTES A LOS RAYOS UV.

MUESTRAS	RANGO
BLANCO	C
POSITIVO (PABA)	A
NEGATIVO	B
EXTRACTO Q 6.02 (Acetato de etilo)	B,D
EXTRACTO Q 14 (Acetato de etilo + Etanol absoluto)	B
EXTRACTO Q 78.3 (Agua)	A

En la tabla No.10 el test de Tukey, demuestra que si hay diferencia significativa entre las muestras, por lo tanto existen bacterias sobrevivientes en C que es el blanco, y seguido esta B y D que es el sub-extracto Q 6.02 (Acetato de etilo).

GRÁFICO No. 2 ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA CON *Escherichia coli* POR IRRADIACION UVB (312nm). LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.



El gráfico demuestra que el mejor extracto obtenido es el Q 6.02 (acetato de etilo) que presenta semejanza con el blanco.

3.9 FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FSP) POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN LA LUZ UVB

Los resultados obtenidos en el extractos del aliso (*Alnus acuminata*) demuestran la actividad de dispersar la luz en el rango ultravioleta en relación con los fotoprotectores físicos comerciales, evaluados mediante la ecuación de Mansur (Ver anexo No. 6, 7,8 y 9)

TABLA No. 11 VALORES DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FSP) DEL CONTROL POSITIVO (PABA), DEL EXTRACTO Q 6.02 (ACETATO DE ETILO), Q 14 (ACETATO DE ETILO+ ETANOL) Y Q 78.3 (AGUA) CALCULADOS MEDIANTE LA ECUACIÓN DE MANSUR. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.

λ nm	FPS (FACTOR DE PROTECCION SOLAR)			
	PABA	Q 6.02	Q 14	Q 78.3
290	0.4899	0,3852	0.2433	0.1837
295	1.0133	1,7026	1.1609	0.8897
300	3.2016	4,5380	3.5494	2.9401
305	2.0267	3,9697	3.1901	2.8420
310	2.9725	1,8323	1.1985	1.0121
315	2.174	0,7064	0.3658	0.3675
320	0.4944	0,1377	0.0401	0.0574
FPS	12.372	13,272	9.748	8.292

Según la ecuación de Mansur (MANSUR, J. y otros., 1986) se determinó el FPS a diferentes longitudes de onda (290 a 320 nm) en el espectrofotómetro, del control positivo PABA fue de 12.37 ± 1.13 , del extracto Q 6.02 (Acetato de etilo) obteniéndose el 13.27 ± 1.74 , del Q 14 (Acetato de etilo+ etanol) el 9.75 ± 1.42 y del Q 78.3 (Agua) el 8.29 ± 1.21 de factor de protección solar.

ANALISIS ESTADISTICO

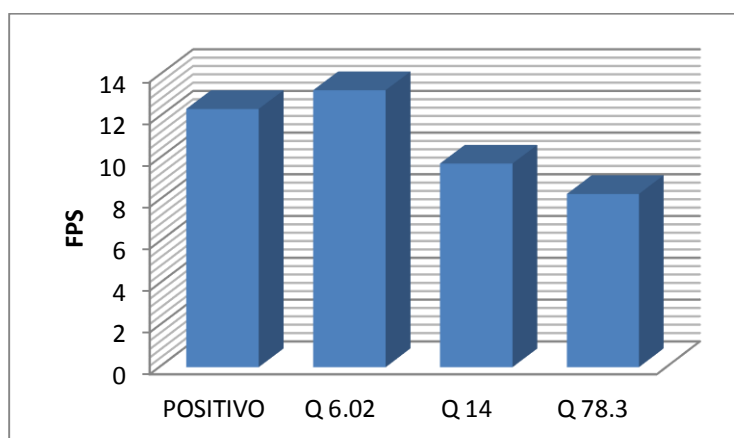
Se aplicó el test estadístico Anova en donde el valor de p fue de 0.0002^{-3} , por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir que al menos un dato es diferente de los demás.

TABLA No. 12 PRUEBA DE TUKEY AL 5% DEL FPS.

MUESTRAS	RANGO
PABA	C
Q 6.02	D
Q 14	B
Q 78.4	A

Por tal motivo se aplicó el test Tukey al 95% de significancia, el mismo que demuestra que si hay diferencia significativa entre las muestras, en donde D posee el mayor el FPS el mismo que corresponde al sub-extracto Q 6.02 (Acetato de etilo).

GRÁFICO No. 3 COMPARACIÓN DEL FPS ENTRE EL CONTROL POSITIVO (PABA), EL SUB-EXTRACTO Q 6.02 (Acetato de etilo), Q 14(Acetato de etilo+ etanol) Y Q 78.3 (Agua). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL. ESPOCH. JULIO 2014.



El factor de protección solar (FSP) fue de $13,27 \pm 1.74$ en el UVB, comparado con el control positivo (PABA) que tiene un FPS de 12.37 ± 1 .

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

1. En el análisis físico químico del vegetal se concluye que el porcentaje de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico están dentro de los parámetros establecidos por la Farmacopea Española 2002 para productos naturales.
2. Según el screening fitoquímico realizado de los extractos de aliso (*Alnus acuminata*) se identificó la presencia de triterpenos, esteroides y flavonoides en gran cantidad además la presencia de azúcares reductores, quinonas, lactonas cumarinas y taninos que se encuentran en menor porcentaje.
3. En el barrido espectral realizado de 200 a 400 nm a los extractos se determinó los picos más pronunciados en los extractos Q 6.02 (Acetato de etilo), Q 14.0 (Acetato de etilo + etanol), y Q 78.3 (Agua). Los mismos que presentan flavonoides como flavonoles, flavonas y chalconas.
4. Según la cromatografía en capa fina se obtuvo un Rf de 0.48 en todos los extractos, posiblemente se trató de una flavona que es la quercetina, además obtuvo una fluorescencia color naranja.

Además en el extracto Q6.02 (Acetato de etilo) se obtuvo un Rf de 0.63 que al ser comparada con estudios demuestra la presencia de ácido ferúlico.
5. El porcentaje de flavonoides en el Aliso (*Alnus acuminata*) fue de $1.33\% \pm 0.22$ en base a quercetina o 13.0 mg/g de planta.

6. En la evaluación de la actividad fotoprotectora in vitro de los extractos Q 6.02 (acetato de etilo), Q 14 (acetato de etilo + etanol) y Q 78.3 (agua). Se concluyó que el extracto Q 6.02 (acetato de etilo), presenta actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB inducido por muerte celular obteniéndose $3,6 \times 10^7$ UFC/ml en 30 minutos, en relación con el blanco que no fue irradiado con el $3,8 \times 10^7$ UFC/ml.

Y el factor de protección solar obtenido in vitro mediante espectrofotometría se obtuvo el 13.27% en relación con el control positivo (PABA) que tienen el 12.37%.

7. Se concluyó que los espectros de absorción obtenidos de los extractos coinciden con la actividad de fotoprotección y con los valores de FPS (factor de protección solar), además los componentes que le proporcionan la actividad posiblemente son quercetina y el ácido ferúlico.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. En la prueba de la actividad fotoprotectora realizada con *E. coli* para determinar el número de bacterias sobrevivientes se observó que en el sub-extracto Q78.3 (Agua) murieron la mayoría de bacterias en comparación con los otros extractos por tal motivo se recomienda realizar estudios para comprobar la actividad antibacteriana del mismo.
2. Realizar estudios toxicológicos para que puedan ser aplicados en la industria cosmética.
3. Realizar estudios in vivo para comprobar la actividad fotoprotectora y verificar si el FPS es el mismo del realizado en los estudios in vitro.

CAPÍTULO VI

6. BIBLIOGRAFÍA

ABREU, E. y otros. 2004. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 40. No. 3 Brasil pp. 381-385

ÁCIDO FERÚLICO

<http://www.ar-revista.com/belleza/cara-y-cuerpo/acidos-a-favor-de-tu-piel/acido-ferulico-protege>

20141010

AGUILAR, M. 2011. Anti-inflammatory activities, triterpenoids, and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *Arguta*. Vol. 49. N. 10. México. pp 1052-1057

ESPAÑA., AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS. Real farmacopea Española. Madrid (España). 2003, pp 3337- 3934.

ALONSO, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Buenos Aires (Argentina). Corpus. pp. 564-567.

APAZA, L. 2006. Elaboración y evaluación de una forma galénica de origen vegetal con actividad fotoprotectora. Tesis. La paz (Bolivia). Universidad mayor de San Andrés. p. 21

AVILA, J. y otros. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. (Fitoterapia). México. s.e. pp. 301-309.

BALLON, M., FERREYRA, M. 1995. Aislamiento e identificación de flavonoides. Tesis (Bioquim. Farm.) Universidad de San Marcos. Facultad de Farmacia y bioquímica Perú. pp. 30- 38.

CENTRAL ECUATORIANA DE SERVICIOS AGRÍCOLAS. Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador. Quito. Cesa. p. 8.

CUBA., MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. (MINSAP). 1992. Droga Cruda. Métodos de Ensayo.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200009
20141014

CHOQUENET, B. 2008. Quercetin and rutin as potential sunscreen agent: determination of efficacy by an in vitro method. Journal of Natural Products. Vol. 71. N. 6. Francia. pp 1117- 1118

DALLACQUA, S., MIOLO, G., INNOCENTI, G. The photodegradation of Quercetin; relation to oxidation

<http://www.mdpi.com/1420-3040/17/8/8898/htm>
20141008

DUTRA, E. y otros. 1994. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas Vol. 40. No.3 Sao Paulo (Brasil). pp. 381-385.

DOMINGUEZ, S., XORGE, A. 1993. Métodos en la investigación fotoquímica. México. Limusa. p. 58.

FAHLMAN, B. 2010. In vitro studies to assess the potential of Quercetin as a topical sunscreen; photooxidative properties, photostability and inhibition of UV radiation-mediated skin damage. Tesis. (Doctor in philosophy). Canada. University of Saskatchewan. p. 54.

FROHNMEYER, H., STRAIGER, D. 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. American Society of plant Biologists. Germany. Board and staff. pp. 1420 -1428.

GEILFUS, F. 1994. Manual de agroforestería para el desarrollo rural. Turrialba (Costa rica). s.e. pp. 463-465

GONZÁLEZ, F. 2010. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de Chía (*Salvia hispanicaL.*) mediante electroforesis capilar. Tesis. (Maestro en ciencias de alimentos). México. Instituto politécnico nacional de ciencias biológicas. p. 10

GONZÁLEZ GUERRA, E., GUERRA TAPIA, A. 2010. Envejecimiento de la piel y mucosas. Fotoprotección. Buenos Aires (Madrid). Médica Panamericana. p. 614.

GRANADOS, R. 2003. Microbiología, bacteriología, medios de cultivo, pruebas bioquímicas, micología general, parasitología general. Madrid. Thomson. pp 235-247.

HARRIS, M. 2008. Análisis Químico Cuantitativo. 2^a.ed. Barcelona Iberoamérica. p. 619.

HUANG, L. y otros.1993.Effects of supplementary UVB radiation on rice and pea plants. Alemania. s.e. pp. 129-142.

IACHINI, A., BONADEO, I. s/a. Tecnología cosmética- corso di prodotti cosmetici. 2a. ed. Milán (Italia). Librería cortina. pp. 29-32.

JÁTIVA, C. 2000. Texto Básico de Fitoquímica. Ecuador. s.e. pp. 19-21.

KALEMBA, D., KUNICKA, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Polonia. p. 29.

KONEMAN, E. 2004. Diagnostico de microbiología. 5a. ed. Buenos aires. Médica panamericana. pp. 238-239, 245,256.

KUMAR, A. 2010. Estimation of Gallic acid, rutin and quercetina in *terminalia chebulady* HPTLC. Journal of pharmaceutical sciences. Vol. 3. N. 1. Pp 1-6

LAPOSI, P. y otros s/a. Responses of leaf traits of European beech (*Fagus sylvatia L.*) saplings to suplementar UVB radiation and UVB exclusion. Barcelona. s.e. pp. 149, 745,755

LEON, V., LEON, J. Acido ferúlico.

<http://www.formulistasdeandalucia.es/ficheros/8771ACIDO%20FERULICO.doc>
20141014

LIU, L., GITZ, D. 1995. **Effects** of UVB on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. s.e. pp. 725-733.

LOCK, O. 1994. Investigación Fotoquímica. 2a ed. Perú. Fondo. pp. 269-279, 286.

LOWE, N. 1990. Sunscreens and the prevention of skin. s.e. pp. 16, 936-938.

MANSUR, J. y otros. 1986. Determinação do factor de proteção solar por espectrofotometría. Rio de Janeiro. s.e. pp. 121-124.

MORA, M. y otros. 2006. The sun: enemy of our skin. Medisan Vol.14. N. 6. Santiago de cuba (Cuba) pp. 1-30

MIDDLETON, P. 2005. Antioxidant, antibacterialactivities and general toxicity of *Alnus glutinosa*. Pharm. Iran.

MIRANDA, M. 2000. Farmacognosia y Productos naturales. Habana (Cuba). s.e. pp. 40-60.

MORENO, M., MORENO, L. s/a. Fotoprotección. Revista colombiana de dermatología. Vol. 18. Colombia. pp. 31-39.

MURRAY, J. 2008. Atopical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferúlico acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. Journal of the American Academy of Dermatology. Vol. 59. N. 3. pp. 59, 418-425.

PARRISH, J., WHITE, H., PATACK, M. 1979. Dermatology in general medicine. 2a. ed. New York. McGraw-Hill. pp. 942-994.

PLANTAS MEDICINALES

<http://es.wikipedia.org/wiki/Anexo:Plantasmedicinales%28A-B%29>
20101012

PUENTES, O., BAQUERO, A., LINARES, C. 2002. Enfermedades producidas por radiaciones ultravioleta. Revista Peruana de Dermatología. Vol. 12. N. 2 Perú. pp. 1-20

RUBENSTEIN, R. y otros. 1999. The Health impact of Solar Radiation. The health impact of solar radiation and prevention strategies. AcadDermatol. pp. 41, 82-84.

SAIJA, A., TOMAINO, A., TROMBETTA, D. 2000. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferúlico acids as topical photoprotective agents. Roma (Italia). pp. 199, 39-47.

SATI, S. 2011. Bioactiveconstituents and medicinal importance of genus *Alnus*. Pharmacogn Rev. Vol. 5 N. 10 Estados unidos. pp. 174-183

SAYRE, R., y otros. 1979. Comparison of in vivoand in vitro testing of suncreening formulas. Oxford. s.e. pp. 559-566.

SERGEY, A. 2012. Investigación de productos naturales: cartas del producto anteriormente naturales. Vol. 26. N. 19 pp. 1806-1816

SERRA-BALDRICH, E. 1991. Antioxidantes: actualidad dermatológica. Universidad de granada. Caracas. s.e. p. 56

SPENCER, J., AMONETTE, R. 1995. Indoor tanning: risks, benefits, and future trends. Acad Dermatol. pp. 33,288-198.

SORDO, C. Métodos empleados para determinar el grado de protección de los fotoprotectores frente a la radiación UV.

<http://antoniorondonlugo.com/blog/wp-content/uploads/2010/05/161-M%C3%A9todos-empleados-para-determinar-el-grado-de-fotoprotecci%C3%B3n.pdf>.

20141014

TEVINI, M., TERAMURA, A. 1989. UVB effects on terrestrial plant. Alemania. s.e. pp. 479-487.

WAGNER, H. 1996 Análisis de plantas y drogas. 2a ed. Berlín (Alemania). Verlag. pp. 334-347.

WINUTHAYANON, W. 2009. Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant *Curcuma comosa*: biologic actions in vitro and in vivo indicate estrogen receptor-dependent mechanisms . Revista pubmed. **Vol. 117. N. 7 pp. 61**

YU, Y. 2007. Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from *Alnus firma* on HIV-1 viral enzymes. Pharm. p. 6

YUE, M., WANG, X. 1998. Effects of enhanced UVB radiation on crop structure, growth and field components of spring wheat under field conditions. s.e. pp. 233-263.

YUFERA, E. 2007. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Barcelona. Reverte. pp. 1223-1224

CAPÍTULO VII

7. ANEXOS

ANEXO No. 1 Obtención de los extractos Q 14 (acetato de etilo+ etanol) y Q 18 (acetato de etilo+ etanol).

Determinación de la constante dieléctrica (Q) 14

$$Q = \frac{QAxC\%A + QB\%B}{100}$$

$$\%A = 100 - \%B$$

A= Q del acetato de etilo (6.02)

B= Q del etanol (24.3)

$$14 = \frac{6.02(100 - \%B) + 24.3(\%B)}{100}$$

$$\%B = 43.65$$

$$\%A = 56.35$$

Determinación de la constante dieléctrica (Q) 18

$$Q = \frac{QAxC\%A + QB\%B}{100}$$

$$\%A = 100 - \%B$$

A= Q del acetato de etilo (6.02)

B= Q del etanol (24.3)

$$18 = \frac{6.02(100 - \%B) + 24.3(\%B)}{100}$$

$$\%B = 65.54$$

$$\%A = 34.46$$

ANEXO No. 2 Elaboración de extractos fraccionados

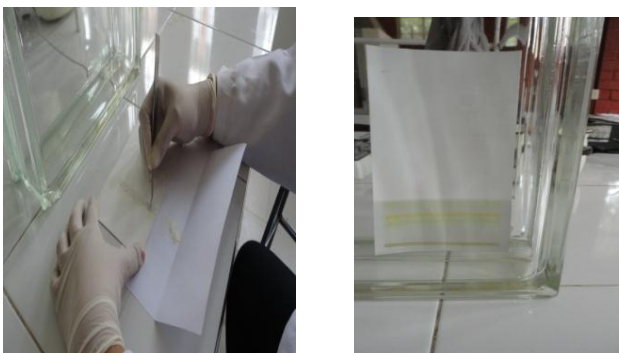
EXTRACTOS	IMAGEN
Q 1.89 (HEXANO)	
Q 4.34 (ETER ETILICO)	
Q 6.02 (ACETATO DE ETILO)	
Q 14.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	

Q 18.0 (ACETATO DE ETILO + ETANOL)	
Q 24.3 (ETANOL)	
Q 78.3 (AGUA)	

ANEXO No. 3 Determinación del pH



ANEXO No. 4 Purificación de compuestos



ANEXO No. 5 Actividad fotoprotectora en *E. coli*



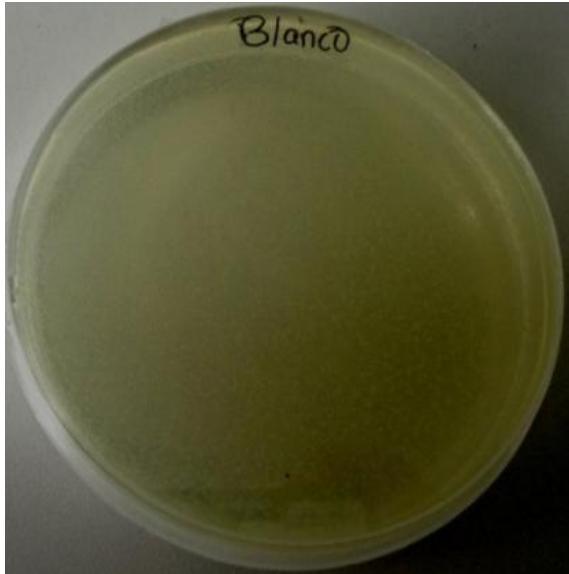
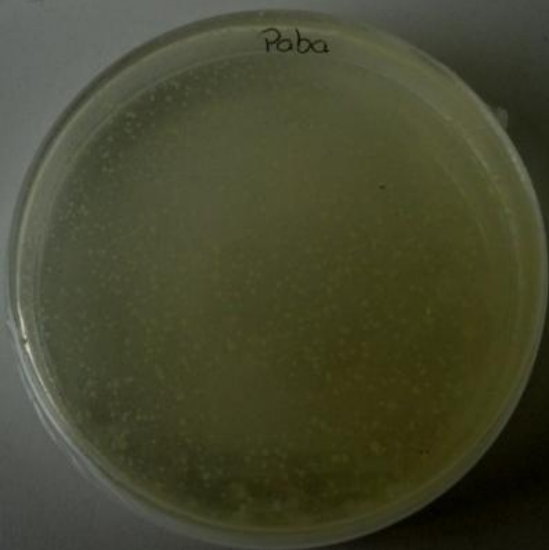
CEPA DE *E. coli* ATCC 25922

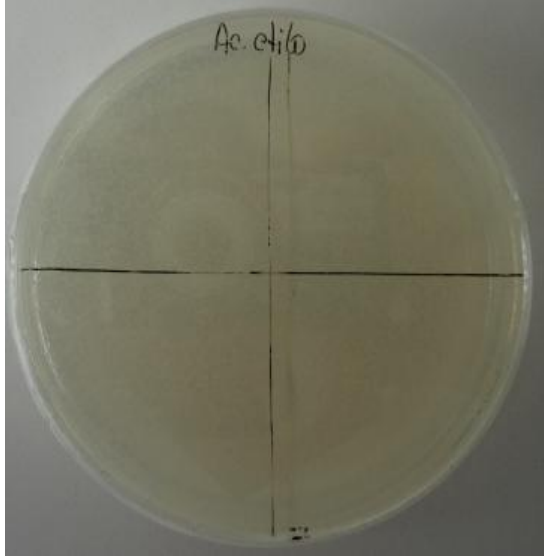
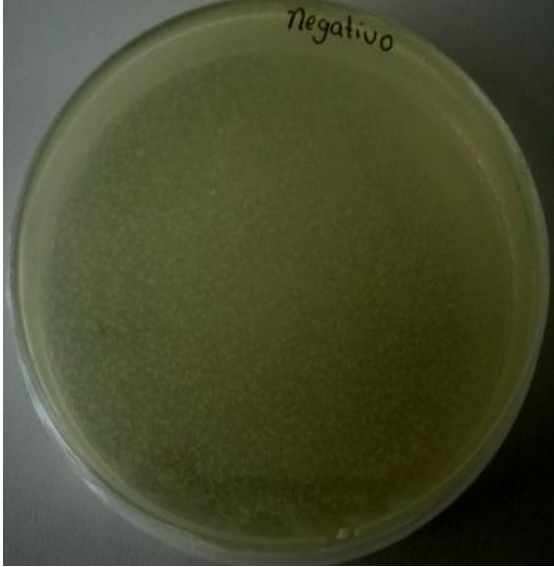

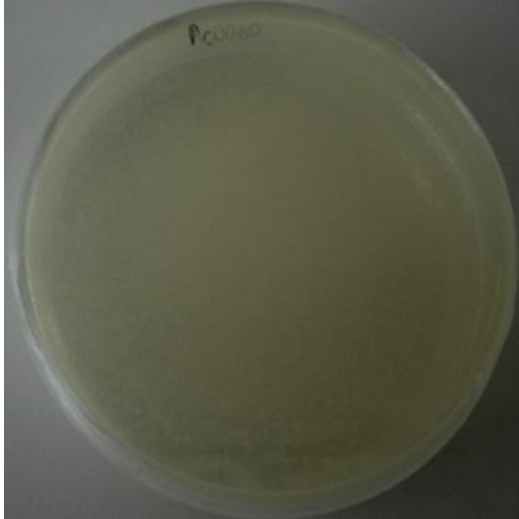


TUBOS DE CUARZO



TABLA No. 13 ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA EN *E. coli* AL INDUCIR RAYOS UV.

BLANCO	POSITIVO (PABA)
	

EXTRACTO Q 6.02 (Acetato de etilo)	NEGATIVO
	
EXTRACTO Q 14 (Acetato de etilo + Etanol absoluto)	EXTRACTO Q 78.3 (Agua)
	

FACTOR DE PROTECCION SOLAR

ANEXO No. 6 Valores del factor de protección solar (FSP) del extracto Q 6.02 (Acetato de etilo) calculados mediante la ecuación de Mansur.

Long. De onda	FC	EI x II	ABS. M	FSP Cal.
290	10	0,015	2,568	0,3852
295	10	0,0817	2,084	1,702628
300	10	0,2874	1,579	4,538046
305	10	0,3278	1,211	3,969658
310	10	0,1864	0,983	1,832312
315	10	0,0839	0,842	0,706438
320	10	0,018	0,765	0,1377
				13,271982

FSP= 13,27± 1.74

ANEXO No. 7 Valores del factor de protección solar (FSP) del extracto Q 14 (Acetato de etilo + etanol) calculados mediante la ecuación de Mansur.

Long. De onda	FC	EI x II	ABS. M	FSP Cal.
290	10	0,015	3,266	0,4899
295	10	0,0817	1,254	1,0245
300	10	0,2874	1,119	3,216
305	10	0,3278	0,637	2,088
310	10	0,1864	1,605	2,9917
315	10	0,0839	2,469	2,0715
320	10	0,018	2,751	0,4952
				12,3768

ANEXO No. 8 Valores del factor de protección solar (FSP) del extracto Q 78.3 (Agua) calculados mediante la ecuación de Mansur.

Long. De onda	FC	EI x II	ABS. M	FSP Cal.
290	10	0,015	1,324	0,1837
295	10	0,0817	1,125	0,8897
300	10	0,2874	1,023	2,9401
305	10	0,3278	0,867	2,842
310	10	0,1864	0,654	1,0121
315	10	0,0839	0,543	0,3675
320	10	0,018	0,438	0,0574
				8,2925

ANEXO No. 9 Valores del factor de protección solar (FSP) del control positivo (PABA) calculados mediante la ecuación de MANSUR.

Long. De onda	FC	EI x II	ABS. M	FSP Cal.
290	10	0,015	3,266	0,4899
295	10	0,0817	1,254	1,0245
300	10	0,2874	1,119	3,216
305	10	0,3278	0,637	2,088
310	10	0,1864	1,605	2,9917
315	10	0,0839	2,469	2,0715
320	10	0,018	2,751	0,4952
				12,3768

FSP= 12.37%± 1.13

ANEXO No. 10 Análisis estadístico

ANOVA DE UN FACTOR DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA EN *E. coli*

23/10/2014 21:43

Anova Un Factor

Variable Respuesta: VAR-2
Variable Explicativa: VAR-1
Número de Casos: 18

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	11.3378	5	2.2676	27.2107	0.0004E-2
Dentro Grupos	1.0000	12	0.0833		
Total (corr.)	12.3378	17			

TEST DE TUKEY DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA EN *E. coli*

23/10/2014 21:41

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

Variable Respuesta: VAR-2
Variable Explicativa: VAR-1
Número de Casos: 18

Método: LSD al 95.00%

VAR-1	N	Media	Grupos Homogéneos
Q 78.3	3	1.6000	X
POSITIVO	3	2.1000	X
NEGATIVO	3	3.1667	X
Q 14	3	3.2000	X
Q 6.02	3	3.6333	X X
BLANCO	3	3.7667	X

ANOVA DE UN FACTOR DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR

23/10/2014 22:04

Anova Un Factor

Variable Respuesta: VAR-2
Variable Explicativa: VAR-1
Número de Casos: 12

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Entre Grupos	47.5336	3	15.8445	160.8991	0.0002E-3
Dentro Grupos	0.7878	8	0.0985		
Total (corr.)	48.3214	11			

TEST DE TUKEY DEL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR

23/10/2014 22:05

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

Variable Respuesta: VAR-2
Variable Explicativa: VAR-1
Número de Casos: 12

Método: LSD al 95.00%

VAR-1	N	Media	Grupos Homogéneos
Q 78.3	3	8.2967	X
Q 14	3	9.7567	X
POSITIVO	3	12.3700	X
Q 6.02	3	13.2667	X
