



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS
DE *Parmelina tiliacea*”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: ENRIQUE JAVIER URBINA LOPEZ

TUTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2016

Declaración de autenticidad

Yo, Enrique Javier Urbina López, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba, 8 de enero del 2016

Enrique Javier Urbina López

Cédula de identidad 1803984408

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

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS DE *Parmelina tiliacea*.” de responsabilidad del joven egresado Enrique Javier Urbina López, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF Diego Vinuesa Tapia M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF Fausto Contero Bedoya

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dra. Susana Abdo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, Enrique Javier Urbina López, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en este Trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

ENRIQUE JAVIER URBINA LÓPEZ

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de titulación a mis padres y maestros que me han brindado el apoyo necesario para conseguir este objetivo de mi vida profesional.

Javier

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser el lugar donde me formé personal y académicamente para conseguir este objetivo.

De igual forma mi sincero agradecimiento al BQF Diego R. Vinueza T. M. Sc, quién a lo largo de mi carrera ha impartido conocimientos académicos y morales mostrando su apoyo y su valiosa amistad.

A la Dra. Susana Abdo y al BQF Fausto Contero por su ayuda y aporte brindados en el desarrollo del presente trabajo.

En general a todas las personas que de una u otra manera me mostraron su apoyo durante mi carrera académica.

Javier

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC	área bajo la curva
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATCC	American type culture collection
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
FPS	Factor de protección solar
h	horas
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
OMC	octilmetoxicinamato
OMS	Organización Mundial de la Salud
Rf	factor de retención
TLC	Thin layer chromatography
UFC	Unidades formadoras de colonia
uL	microlitro
UV	Ultravioleta
UVA	Radiación ultravioleta A
UVB	Radiación ultravioleta B
UVI	índice ultravioleta
W/m²	Intensidad de radiación

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACION DE RESPONSABILIDAD.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Radiación UV.....	4
<i>1.1.1 Rayos UVA.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2 Rayos UVB.....</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 Rayos UVC.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.4 Índice solar mundial.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.5 Protector solar.....</i>	<i>8</i>
<i>1.1.6 Factor de protección solar.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.7 Seguridad de los protectores solares.....</i>	<i>9</i>
1.2 Extracto vegetal.....	9
1.3 Líquen.....	10
<i>1.3.1 Compuestos liquénicos.....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.2 Fitoquímica de los líquenes.....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3 Parmelina tiliacea.....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.4 Datos cromatográficos de compuestos liquénicos.....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.5 Valores Rf estándar para compuestos liquénicos.....</i>	<i>15</i>

1.4	Adaptación de los líquenes frente al estrés UV	15
1.5	<i>Escherichia coli</i>	16
1.6	ATCC.....	16
1.7	Clasificación de los filtros UV.....	17
1.7.1	<i>Filtros UV inorgánicos o físicos</i>	17
1.7.2	<i>Filtros orgánicos o químicos</i>	17
1.7.3	<i>Filtros químicos UVB</i>	17
1.8	Antecedentes de la investigación	18
 CAPÍTULO II.....		21
2	MARCO METODOLÓGICO	21
2.1	Lugar de recolección de la muestra.....	21
2.2	Lugar de investigación.....	21
2.3	Descripción botánica.....	21
2.4	Acondicionamiento del material vegetal.....	21
2.5	Obtención de extracto seco de <i>Pamelina tiliacea</i>	22
2.6	Preparación de subextractos.....	22
2.7	Cromatografía de capa fina	22
2.8	Preparación de estándar Mc Farland.	23
2.9	Efecto protector frente a la radiación UVB por muerte celular inducida	24
2.10	Determinación de factor de protección solar (spf) <i>in vitro</i>	24
2.11	Análisis estadístico de datos	25
 CAPÍTULO III.....		27
3	MARCO DE RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
3.1	Extracto seco	27
3.2	Cromatografía en capa fina	27
3.3	Curva de calibracion estandar Mc Farland	31
3.4	Efecto de protección solar método de muerte celular inducida.....	32
3.5	Área bajo la curva de subextractos y controles.....	38
3.5.1	<i>20 ppm</i>	39
3.5.2	<i>200 ppm</i>	39
3.5.3	<i>2000ppm</i>	40
3.6	Factor de protección solar.....	42

CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
GLOSARIO DE TERMINOS	49
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1-3	Cromatografía de capa fina de subextractos liquénicos.....	29
Tabla 2-3	Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente A.....	30
Tabla 3-3	Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente B.....	31
Tabla 4-3	Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente C.....	31
Tabla 5-3	Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente G.....	31
Tabla 6-3	Efecto fotoprotector subextracto de acetato de etilo.....	33
Tabla 7-3	Efecto fotoprotector subextracto hexánico.....	34
Tabla 8-3	Efecto fotoprotector subextracto etanólico.....	35
Tabla 9-3	Efecto fotoprotector subextracto clorofórmico.....	35
Tabla 10-3	Efecto fotoprotector Octilmetoxycinamato.....	36
Tabla 11-3	Efecto fotoprotector pamidato.....	37

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1-1	Radiación UV y piel	6
Figura 2-1	Espectro electromagnético.....	8
Figura 3-1	Compuestos liquénicos dépsidos que actúan como filtros UV.....	12
Figura 4-1	Compuestos liquénicos depsidonas que actúan como filtros UV	12
Figura 5-1	Biosíntesis de metabolitos secundarios de líquenes.....	14
Figuro 6-1	Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto etéreo liquénico.....	15
Figura 7-1	Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto etanólico liquénico.....	15
Figura 8-1	Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto acuoso liquénico.....	16
Figura 9-1	Compuestos liquénicos de varias especies	15
Figura 10-1	Valores Rf de compuestos liquénicos.....	15
Figura 1-2	Preparación de estándar de Mc Farland.....	23
Figura 2-2	Los valores de EE X I preestablecidos	25
Figura 1-3	Curva de calibración del estándar Mc Farland	311
Figura 2-3	Efecto fotoprotector subextracto de acetato de etilo	333
Figura 3-3	Efecto fotoprotector subextracto hexánico I, II, III	333
Figura 4-3	Efecto fotoprotector subextracto etanólico I, II, III.....	344
Figura 5-3	Efecto fotoprotector subextracto clorofórmico I, II, III.....	355
Figura 6-3	Efecto fotoprotector octilmetoxicinamato I, II, III.....	366
Figura 7-3	Efecto fotoprotector pamidato I, II, III.....	377
Figura 8-3	Valores de área bajo la curva de subextractos y controles	388
Figura 9-3	Unidades formadoras de colonia de E.coli vs tiempo 200ppm	41
Figura 10-3	Unidades formadoras de colonia de <i>E.coli</i> vs tiempo 200ppm	411
Figura 11-3	Unidades formadoras de colonia de E.coli vs tiempo 20ppm	422
Figura 12-3	Factor de protección solar subextracto hexánico.....	433
Figura 13-3	Factor de protección solar subextracto de acetato de etilo	444
Figura 14-3	Factor de protección solar subextracto clorofórmico	444
Figura 15-3	Factor de protección solar subextracto etanólico	455

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A Análisis estadístico 20ppm.....	68
ANEXO B Análisis estadístico 200ppm.....	69
ANEXO C Análisis estadístico 2000ppm.....	70

RESUMEN

Debido a la capacidad de los líquenes para biosintetizar compuestos ante la exposición a la radiación solar se ha obtenido un extracto blando alcohólico a partir del cual derivan sub-extractos hexánico, acetato de etilo, clorofórmico y etanólico para valorar su capacidad para ser utilizados como filtros UVB. El índice UV del Ecuador se incrementa notablemente al pasar el tiempo; por tanto existe una cantidad considerable de radiación UVB que incide sobre la población la misma que puede causar efectos adversos sobre la salud. El extracto blando se redisolvió en cada uno de los solventes a concentraciones de 20ppm, 200ppm y 2000ppm; además se utilizaron octilmetoxicinamato y pamidato como controles. Se llevaron a cabo el método de muerte celular inducida por radiación UVB haciendo uso de una cepa de *Escherichia coli* ATCC (29522) para el análisis de la capacidad fotoprotectora y la ecuación de Mansur para la determinación del factor de protección solar in vitro. El número de unidades formadoras de colonias de *E. coli* sobrevivientes tras exposición a radiación UVB fueron transformados en valores de área bajo la curva durante el tiempo de ensayo de 4h. El subextracto etanólico mostro un efecto fotoprotector mayor que los otros subextractos a las concentraciones propuestas. A 2000ppm los subextractos hexanico, acetato de etilo y clorofórmico muestran un efecto fotoprotector comparable con los controles. El factor de protección solar a 200ppm fue 1.98, 7.79 ,9.17 y 12.07 para los subextractos hexánico, acetato de etilo, clorofórmico y etanólico respectivamente. Cabe resaltar que tanto el efecto fotoprotector como el FPS aumentan de manera proporcional a la concentración de cada subextracto.

Palabras clave: <LÍQUEN [*Parmelina tiliacea*]>,<SUBEXTRACTO>,<FOTOPROTECCIÓN>,<ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA>,<FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR>,<RADIACIÓN UVB>.

SUMMARY

Due to the capacity of lichens to synthesize compounds when exposed to sun radiation, it has been possible to obtain a dry extract from which many sub extracts such as hexane, ethyl acetate, chloroform and ethanol are obtained in order to evaluate their capacity to be used as UVB filters, since the UV index in Ecuador is clearly increasing, so there is an important amount of UVB radiation affecting the population, this can cause adverse effects on health. The dry extract was dissolved in each one of the solvents at different concentrations, for example: 20ppm, 200ppm, and 2000ppm; in addition octylmethoxycinnamate and Pamidate were used as control. The UVB radiation-induced cell death was carried out with the use of *Escherichia coli* ATCC (29522) strain to analyze the photoprotecting capacity as well as Mansur equation for the in vitro sun protection factor determination. The number of *Escherichia coli* colony forming units which survived after being exposed to the UVB radiation were transformed into values of area under the curve during a four-hour trial period. The ethanol sub extract showed a higher photoprotecting effect related to the other sub extracts at the proposed concentrations. At 2000ppm the hexane, ethyl acetate, and chloroform showed a photoprotecting effect which is comparable to the controls. The sun protection factor at 200ppm was 1.98, 7.79, 9.17 and 12.07 for hexane, ethyl acetate, chloroform and ethanol sub extracts respectively. It is worth nothing that both the photoprotecting effect and the FPS increase proportionally to the concentration each sub extract has.

Key words: < [*Parmelina tiliacea*] LICHEN>, < [*Parmelina tiliacea*] SUB EXTRACT>, < PHOTOPROTECTION>, < PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY>, < SUN PROTECTION FACTOR>, < UVB RADIATION>

INTRODUCCIÓN

La presente investigación se basa en los efectos en la salud de los seres humanos provocados por la exposición a la radiación UV. Dicha exposición puede resultar en efectos graves y crónicos en la piel, ojos y sistema inmune. El eritema de la piel tras la exposición a la radiación es el efecto que se observa comúnmente. Además es probable la inducción de cambios degenerativos en las células de la piel, tejido fibroso, venas conllevando al envejecimiento temprano de la piel, fotodermatosis, queratosis actínica y una reacción inflamatoria en los ojos. (Organization World Health, 2015, <http://www.who.int/uv/health/en/>)

Los efectos más serios de exposición crónica a la radiación son el cáncer de piel y las cataratas. La radiación solar constituye un problema de salud a nivel mundial provocando un incremento de la incidencia de cáncer de piel que afecta al ser humano. La exposición crónica a la luz solar al igual que las quemaduras que se generan durante la niñez y adolescencia incrementan el riesgo para el desarrollo del cáncer de piel (Vidrio, 2003, pp.4-8).

Se distinguen varias causas por las cuales la intensidad de la radiación va en aumento. El índice UV solar máximo de exposición para el ser humano, según la Organización Mundial de la Salud, es de 11 W/m^2 . La Agencia Espacial Civil Ecuatoriana manifiesta específicamente que en la ciudad de Quito el índice UV solar siempre está sobre de 16 y en muchos casos llega a 25 (Castillo, 2012, pp.40-46). La radiación más alta registrada en Quito fue de 18 UVI, entre las 12:00 y 12:30 y en los últimos meses ha alcanzado 23 UVI valores que muestran un fuerte impacto al comparar con el valor máximo propuesto por la OMS (Castillo, 2012, pp.40-46).

Es evidente la necesidad de protegerse frente a la radiación para contrarrestar los efectos sobre la salud. Otro de los factores desencadenantes de una mayor exposición a la radiación es la depleción de la capa de ozono ya que ésta absorbe parte de la radiación UV por lo que se considera a la vez un filtro solar importante. El debilitamiento de la capa de ozono permite la filtración de rayos solares siendo la zona ecuatorial la más afectada por este fenómeno. (El Diario El Comercio, 2012, pp.1-3).

La atmósfera se torna más delgada en la zona ecuatorial aumentando la intensidad de la luz UV; por tal razón la latitud es otro factor a considerar. Además de este último la altura del sol también

influye en la intensidad de luz ya que mientras se encuentre más alto en el cielo se detecta mayor radiación en la tierra (El Diario El Comercio, 2012,pp.1-3).

La radiación UVB (1-10% del total de la radiación) es causante de eritema en la piel, pigmentación tras 24-72 horas de la exposición y se considera de 1000 a 100000 veces más cancerígena que la UVA (Ochoa & Maldonado, 2010,pp.40-45). Por lo tanto, es importante evitar los daños causados en el DNA por la radiación solar (Françoise, Le Dévéhat, & Céline, 2013,pp.17-28).

Por ello, es necesario tomar precauciones y protegerse de la luz solar. Una de las formas empleadas para la protección a la radiación del sol es el uso de protectores solares que son útiles para la prevención de la formación de eritema en la piel tras la exposición a la radiación. El descenso en la cantidad de radiación UV que llega a la piel reduce el riesgo de cáncer inducido por la luz solar (Robles, y otros, 2008,pp.1-2).

El efecto más frecuente es el desarrollo del cáncer de piel. Entre dos a tres millones de cáncer de piel tipo no melanoma son diagnosticados cada año los cuales pueden ser removidos quirúrgicamente. Aproximadamente 130000 melanomas malignos ocurren anualmente alrededor del mundo. Un estimado de 66000 muertes se producen por melanoma y otros tipos de cáncer de piel. Existen varios países en vías de desarrollo que se localizan cerca de la línea ecuatorial, como el Ecuador, en donde se registran altos niveles de radiación UV. (Organization World Health, 2015, <http://www.who.int/uv/health/en/>)

El cambio climático en el Ecuador, se percibe por su efecto en el aumento del cáncer de piel por el debilitamiento de la capa de ozono. Ronnie Nader, Director de Operaciones Espaciales de la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA), señala que los ecuatorianos conviven con un enemigo invisible, los rayos ultravioleta, y que golpean en especial a Quito por estar a 2850 metros de altura. En el Ecuador, la incidencia del cáncer de piel está por encima del cáncer de próstata en el hombre y de seno en la mujer (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2015, <http://www.exa.ec/>).

La tasa de mortalidad en el Ecuador debido al cáncer según los registros hospitalarios de tumores en el año 2010 fue de 64,22 por 100.000 habitantes y entre los tipos de cáncer más frecuentes que afectan es el cáncer de piel (no melanoma). Según el Registro Nacional de Tumores en la ciudad de Guayaquil, la mortalidad para el año 2012 fue del 6% debido al cáncer de piel tipo melanoma mientras que otros tumores malignos de piel constituyen el 11% de los casos. (Diario El Comercio, 2012,pp.1-3)

El principal mecanismo para contrarrestar los efectos de la radiación es el uso de protectores solares. Los compuestos naturales han sido enfocados en varios estudios de fotoprotección por su presumible seguridad, sostenibilidad y bajo impacto ambiental. El interés por el desarrollo de fotoprotectores haciendo uso de compuestos naturales es alto, especialmente en Ecuador, país con gran biodiversidad. Los líquenes frente a altas intensidades de luz tienden a acumular varios pigmentos en su zona cortical, de manera que algunos compuestos liquénicos han demostrado su capacidad fotoprotectora. (Honegger, 1986, pp. 797-808).

Se justifica además la búsqueda de nuevos filtros solares debido a que sus similares orgánicos conllevan ciertos efectos secundarios entre los cuales se puede citar la intolerancia cutánea donde la dermatitis irritativa es la más frecuente en especial en protectores solares con FPS alto. La dermatitis fotoalérgica que aparece únicamente en aquellas zonas expuestas al sol, en especial se considera fototalérgica a la benzofenona-3, el PABA y el Eusolex 8020, así como algunas sustancias empleadas como excipientes. (Geisilaine, 2009, pp. 111-113)

También se les atribuye una cierta acción hormonal ya que suponen tener actividad estrogénica como el 4-metil-benziliden-alcanfor (García & García, 2015, [https://www.asturias.es/_ pdf](https://www.asturias.es/_pdf)). Otro estudio sobre la toxicidad de los filtros químicos UV revela la actividad estrogénica y anti-androgénica del 4-methylbenzylidene camphor y 3-benzylidene camphor (Schlumpf, y otros, 2007, pp.144-151).

La presente investigación tuvo lugar en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de ciencias de la ESPOCH. Sin duda, este estudio contribuyó a los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir específicamente al número tres el mismo que se relaciona a la calidad de vida de los ecuatorianos, ya que aborda un problema de salud en constante incremento en nuestra nación. Además contribuye al uso de los recursos naturales de la región pudiendo formar parte del cambio de la matriz productiva al proveer de materia prima nacional en el desarrollo de nuevos protectores solares.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Radiación UV

La radiación ultravioleta (UV) es parte del espectro electromagnético emitido por el sol. Dentro del espectro UV se distinguen tres rangos UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (100-280 nm) (Ochoa & Maldonado, 2010, pp.40-45). La radiación solar se compone de un 90-99% de UVA y 1-10% de UVB. Considerando rayos UVC (longitudes de onda de 100-280 nm) son absorbidos por el ozono atmosférico, más radiación en el intervalo UVA (315-400 nm) y aproximadamente 10% de los rayos UVB (desde 280 hasta 315 nm) llegan a la superficie de la Tierra. (World Health Organization, 2015, <http://www.who.int/uv/en/>)

Tanto los rayos UVA y UVB son de importancia para la salud humana. Pequeñas cantidades de radiación UV son esenciales para la producción de vitamina D en las personas, sin embargo, la exposición excesiva puede dar lugar a efectos agudos y crónicos en la piel, los ojos y el sistema inmunológico. (World Health Organization, 2015, <http://www.who.int/uv/en/>)

1.1.1 Rayos UVA

Los rayos UVA envejecen a las células de la piel y pueden dañar el ADN de estas células. Estos rayos están asociados al daño de la piel a largo plazo tal como las arrugas, pero también se considera que desempeñan un papel en algunos tipos de cáncer. La mayoría de las camas bronceadoras emiten grandes cantidades de UVA que según se ha descubierto aumentan el riesgo de cáncer de piel. (World Health Organization, 2015, <http://www.who.int/uv/en/>)

1.1.2 Rayos UVB

Los rayos UVB tienen un poco más de energía que los rayos UVA. Estos rayos pueden dañar directamente al ADN de las células de la piel, y son los rayos principales que causan quemaduras de sol. Asimismo, se cree que causan la mayoría de los cánceres de piel. Es causante de foto

carcinogénesis debido a la interacción con el ADN celular con la formación posterior de dímeros de ciclobutanopirimidina y glicoles de timina (Nybakken & Bilger, 2004, pp. 238-241)

1.1.3 Rayos UVC

Los rayos UVC tienen más energía que otros tipos de rayos UV, pero no penetran la atmósfera y no están en la luz solar. No son considerados una causa de cáncer de piel. (American Cancer Society, 2015, <http://www.cancer.org>)

1.1.3.1 Efectos conocidos de la radiación UV sobre la salud

La radiación UVA activa el pigmento melanina ya presente en las células superiores de la piel. Crea un bronceado que aparece rápidamente, pero también se pierde rápidamente. Por otra parte, los rayos UVA penetran en las capas profundas de la piel, donde los tejidos conectivos y los vasos sanguíneos se ven afectados. Como resultado, la piel pierde gradualmente su elasticidad y comienza a arrugarse. Por lo tanto, grandes dosis de radiación UVA causan el envejecimiento prematuro. Además, estudios recientes sugieren que puede conllevar el desarrollo de los cánceres de piel. El presente mecanismo es que este tipo de radiación aumenta el estrés oxidativo en la célula (Skin Cancer Foundation, 2015, <http://www.skincancer.org>).

La radiación UVB estimula la producción de melanina, lo que conduce a un fuerte incremento en el pigmento de color oscuro en unos pocos días. La radiación UVB también estimula las células para producir una epidermis más gruesa. Por lo tanto, este tipo de radiación es responsable tanto para el oscurecimiento y engrosamiento de las capas de células exteriores, las mismas que se consideran reacciones de defensa del cuerpo contra un mayor daño UV. (Skin Cancer Foundation, 2015, <http://www.skincancer.org>)

Al igual que con efectos sobre la piel, los diversos rayos del sol penetran en el ojo a diferentes profundidades. Mientras la radiación UVB es completamente absorbida por la córnea, la de tipo UVA pasa a través de estas capas superficiales. En los adultos sólo el 1 por ciento o menos de la radiación UV entrante llega a la retina debido a la función de filtro de la córnea y el cristalino. En contraste la luz visible fácilmente penetra a través de la retina, donde activa foto receptores y comienza la reacción en cadena de procesos bioquímicos para producir una imagen visible. (Skin Cancer Foundation, 2015, <http://www.skincancer.org/prevention/uva-and-uvb/understanding-uva-and-uvb>)

La mayoría de los experimentos hasta la fecha se han concentrado en los rayos UVB, ya que parece ser más influyente que los rayos UVA para causar inmunomodulación. Se cree que la radiación UV es absorbida por una molécula situada en la piel. Esto conduce a cambios en la distribución y la actividad de algunos de los complejos moleculares y celulares clave del sistema inmune. Un balance alterado de la respuesta inmune a través de las células y los anticuerpos puede reducir la capacidad del cuerpo para defenderse contra ciertas enfermedades. (Skin Cancer Foundation, 2015, <http://www.skincancer.org>)

1.1.3.2 Radiación UV y cáncer de piel

La radiación UV excesiva produce mutaciones genéticas que pueden conducir a cáncer de piel. . La radiación UV es considerada la principal causa de cáncer de piel no melanoma (CPNM), incluyendo el carcinoma de células basales (BCC) y el carcinoma de células escamosas (SCC). La radiación UVA, penetra en la piel más profundamente que la UVB; juega un papel importante en el envejecimiento de la piel y las arrugas. La radiación UVA contribuye e incluso puede iniciar el desarrollo de cáncer de piel. (Yasuhiro, 2004,pp. 298-308)

La radiación UVB es la causa principal de enrojecimiento de la piel y quemaduras de sol, tiende a dañar las capas epidérmicas más superficiales de la piel. Desempeña un papel clave en el desarrollo de cáncer de piel y un papel contributivo en el curtido y foto envejecimiento. (Yasuhiro, 2004,pp. 298-308)

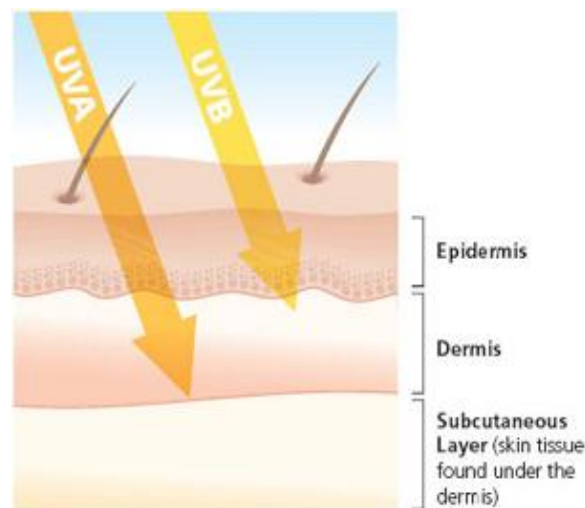


Figura 1-1 Radiación UV y piel
Fuente : Skin Cancer Foundation

1.1.4 Índice solar mundial

El índice UV Solar Mundial representa una estimación del promedio de la radiación ultravioleta (UV) solar máxima en la superficie de la Tierra. La intensidad de la radiación UV que llega a al suelo es variable a lo largo del día pero sus valores se tornan más altos al medio día y especialmente en ausencia de nubes. El cálculo de este indicador hace posible valorar el grado de nocividad para la piel según las distintas longitudes de onda UV. (Colegio de Farmacéuticos de Barcelona, 2015, <http://www.farmaceuticonline.com>)

Se la considera como aquella cantidad máxima de radiación dañina para la piel que llegará a la Tierra al medio día. Sus valores van del cero hacia arriba, lógicamente mientras más alto sea este valor existirá mayor daño en menos tiempo en ojos, piel. En varios países cercanos al ecuador, el índice UV puede llegar a 20 en el verano. (Colegio de Farmacéuticos de Barcelona, 2015, <http://www.farmaceuticonline.com>)

RANGO DE ÍNDICE UV < 2

Bajo riesgo para el ser humano.

RANGO DE ÍNDICE UV 3-5

Riesgo moderado para el hombre. Se recomienda permanecer en la sombra de 10 a.m.-3 p.m. y el uso de ropa protectora contra el sol.

RANGO DE ÍNDICE UV 6-7

Riesgo alto para el hombre. Se recomienda aplicar protector solar con SPF de al menos 30, el uso de ropa protectora y permanecer en la sombra del 10 a.m.-3 p.m.

RANGO DE ÍNDICE UV 8-10

Riesgo muy alto para el individuo expuesto. Es recomendable aplicar protector solar con frecuencia con SPF de al menos 30, usar bálsamo para los labios con protector solar, ropa protectora contra el sol y evitar estar en el sol de 10 a.m.-3 p.m.

RANGO DE ÍNDICE UV > 11

Riesgo extremo para el ser humano. Es necesario aplicar protección solar por lo menos cada 2 horas con SPF de al menos 30, usar bálsamo para los labios con protector solar, ropa protectora contra el sol y evitar estar en el sol de 10 am-3pm. Skin Cancer Foundation, 2015, <http://www.skincancer.org>)

1.1.5 Protector solar

Los protectores solares son productos que combinan varios ingredientes que ayudan a prevenir que la radiación ultravioleta (UV) del sol llegue a la piel. Hay dos tipos de radiación ultravioleta, los rayos UVA y UVB, dañan la piel y aumentar el riesgo de cáncer de piel. Los protectores solares varían en su capacidad de proteger contra los rayos UVA y UVB. Los protectores solares inicialmente estuvieron encaminados para contrarrestar los efectos agudos de la radiación en la piel (Skin Cancer Foundation, 2015, <http://www.skincancer.org>).

En la actualidad, se busca que estos compuestos ejerzan acción frente a los efectos crónicos en busca de la prevención de carcinomas de piel, formación de dímeros de pirimidinas y protección frente a la inmunosupresión cutánea causada por la depleción de las células de Langerhans. (Moreno, 2010,pp.31-39)

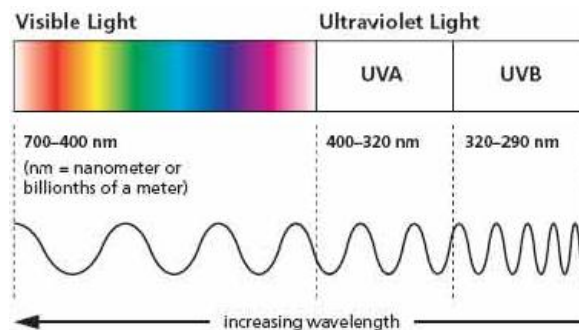


Figura 2-1 Espectro electromagnético

Fuente : Skin Cancer Foundation

1.1.6 Factor de protección solar

“Físicamente el FPS es un número que indica cuál es el múltiplo de tiempo al que se puede exponer la piel protegida para conseguir el mismo efecto eritematoso que se obtendría si no se hubiese aplicado ninguna protección. Este factor se calcula dividiendo la dosis eritematógena mínima (DEM) con la aplicación del filtro solar, entre la DEM sin filtro solar. (Colegio de Farmacéuticos de Barcelona, 2015, <http://www.farmaceuticonline.com>)

El factor de protección solar es considerado como la técnica de referencia para valorar la eficacia de los protectores solares contra la quemadura solar. Este se define como el tiempo de exposición solar necesario para producir eritema mínimo detectable en la piel; se compara el efecto sin ningún tipo de protección con el efecto con el filtro solar. (Colegio de Farmacéuticos de Barcelona, 2015, <http://www.farmaceuticonline.com>)

El FPS mide el efecto de protección frente a la radiación UVB principalmente. Así un FPS 25 ofrece protección contra el 92% de la radiación UVB; en tanto que un FPS30+ lo hace contra más del 97.5%. Se considera que un protector solar debe por lo menos ser de FPS 30+ y que si a este se adiciona filtros UVA se potencia la eficacia en el espectro de radiación UV. (Moreno, 2010,pp.31-39)

1.1.7 Seguridad de los protectores solares

Es evaluada a través de la aparición de irritación, sensibilidad, penetración dérmica y déficit de vitamina D tras la aplicación del producto en la piel. Esto podría llevar a la disminución de la absorción de calcio. (Moreno, 2010,pp.31-39)

1.2 Extracto vegetal

Los extractos vegetales se definen como una mezcla compleja de varios compuestos químicos o metabolitos capaces de presentar actividad farmacológica, Pueden estar en diferente estado físico como los líquidos, las tinturas, semisólidos con textura blanda o densa; sólidas conocidos como extractos secos; todos ellos obtenidos de origen vegetal o de animal. La OMS aclara que aproximadamente el 25% de las fármacos que se comercializan son de origen vegetal y que el 25% de estos contienen principios activos que han sido estructuralmente modificados. (Zapata, 2002,pp.28-35)

1.3 Líquen

Los líquenes son organismos simbióticos entre especies del reino fungi y algae. Es conocido la capacidad de los líquenes para desarrollarse en zonas altas donde la radiación UV es intensa. Los líquenes sintetizan pigmentos que muestran capacidad antioxidante como también muestran una fuerte absorción en la zona del ultravioleta. De tal manera que se ha considerado a los líquenes como filtros UV. Los líquenes pueden sobrevivir en condiciones de longitud de onda corta de alta intensidad, UVA y UVB. (Joel, 2005,pp.136-142)

1.3.1 Compuestos liquénicos

Los compuestos liquénicos pueden clasificarse en los siguientes grupos: sustancias de estructura alifática como ácidos , compuestos zeorin , alcoholes polihidroxiados; sustancias aromáticas incluyendo derivados del ácido pulvínico , dépsidos , depsidones , quinonas derivados de xantonas , derivados difenileneoxide , compuestos que contienen nitrógeno , triterpenos , ácidos tetrónico y los polisacáridos carbohidratos. (Joel, 2005,pp.136-142)

Se han establecido las estructuras químicas de aproximadamente 200 de ellos. Los metabolitos secundarios de líquenes son generalmente insolubles en agua y se pueden extraer en disolventes orgánicos. Ellos ascienden a entre 0,1 y 10 % del peso seco del talo, a veces hasta 30 %. Estas sustancias han sido identificadas principalmente como lactonas, por ejemplo, ácido protolichesterínico , compuestos fenólicos por ejemplo, atranol y resorcinol , dépsidos por ejemplo, ácido difractaico , derivado de ácido pulvínico como el ácido vulpínico, dibenzofuranos y ácido úsnico. Además, otras sustancias como atranorina, ácido estíctico, ácidos lecanórico y pannarina se han estudiado con frecuencia. (Müller, 2001,pp.9-16)

1.3.2 Fitoquímica de los líquenes

Los líquenes en especial su conformación de hongo sintetizan diversos metabolitos secundarios a través de diferentes rutas biosintéticas incluidos la vía del policétido (por ejemplo , ácido úsnico, depsidones , dépsidos , xantonas) , la ruta del ácido shikímico (por ejemplo ciclopéptidos , ácido pulvínico y derivados) y la ruta del ácido mevalónico (por ejemplo, diterpenos , triterpenos, esteroides). Hasta la fecha, más de 1.000 diferentes metabolitos secundarios llamadas sustancias liquénicas son conocidos. (Müller, 2001,pp.9-16)

Los metabolitos secundarios en los líquenes se depositan por lo general como cristales en la superficie de las paredes celulares de las células hifal cortical y medular. La mayoría de estos compuestos bioactivos son exclusivos de los líquenes, siendo de gran relevancia para la sistemática y la filogenia, y se emplean en diferentes niveles taxonómicos de las especies y subespecies. (Müller, 2001,pp.9-16)

Por otra parte, estas sustancias liquénicas juegan un importante papel ecológico en la naturaleza, como la protección UV y la defensa contra los depredadores microorganismos patógenos. Tradicionalmente han sido utilizados estos compuestos en medicina herbaria debido a la actividad farmacológica que presentan siendo así útiles como antimicrobianos, antivirales, antioxidantes, anticancerosos y antiinflamatorios. (Müller, 2001,pp.9-16)

Los primera sustancia liquénica aisladas de las especies que pertenecen a la familia Parmeliaceae fueron el ácido vulpínico del líquen *Evernia vulpina* y el ácido úsnico de *Usnea spp.* A partir de ello, un gran número de diferentes compuestos se han aislado en la familia Parmeliaceae, principalmente por métodos de HPLC. Como ejemplos, compuestos fenólicos tales como atranorina, y cloroatranorina, ácido physódico se identificaron por el método de HPLC con detección UV en los extractos de acetona de *Evernia prunastri* y *Pseudoevernia furfuraceae*. (Müller, 2001,pp.9-16)

La Familia Parmeliaceae comprende alrededor de 2700 especies y representa acerca del 15% del total de las especies liquénicas.

De los 80 géneros incluidos en esta familia, cualquiera de las actividades mencionadas se ha evaluado solamente en alrededor de una cuarta parte del total. El género mejor estudiado desde un punto de vista farmacológico es *Parmelina*, seguido de *Usnea* y *Cetraria*. A nivel de especies, *Cetraria islandica* y *Evernia prunastri* atraen notable interés en sus actividades bioactivas y sus metabolitos. La mayoría de los metabolitos estudiados son aquellos sintetizados a través de la ruta policétido; los compuestos de ácido donde el ácido úsnico y la atranorina destacan entre ellos. (Müller, 2001,pp.9-16)

Los metabolitos secundarios más comunes aislados en la familia Parmeliaceae son el ácido úsnico y la atranorina; ambos constituyentes se encuentran en gran medida en los líquenes. Por lo tanto, el ácido úsnico es característico de las especies de líquenes que tienen la corteza superior de color

amarillo-verde incluyendo el género *Alectoria*, *Evernia*, *Flavoparmelia* y *Usnea* y la atranorina es el compuesto principal en especies con corteza superior gris, tales como del género *Cetrelia*, *Evernia*, *Pseudoevernia* y *Parmelia*. (Müller, 2001, pp.9-16)

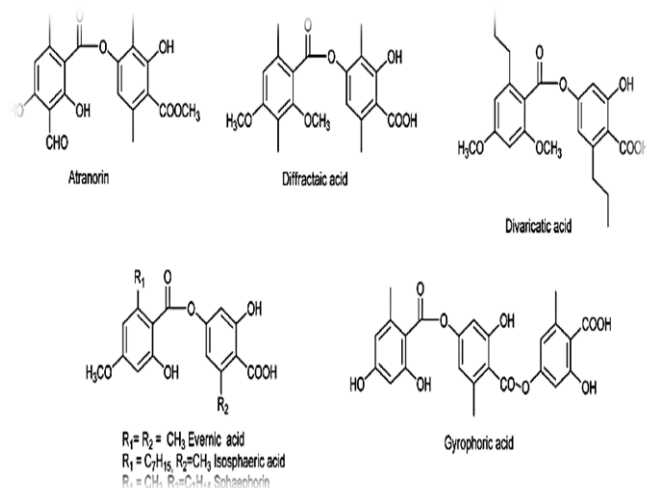


Figura 3-1 Compuestos liquénicos dépsidos que actúan como filtros UV
 Fuente: Nguyen, 2013

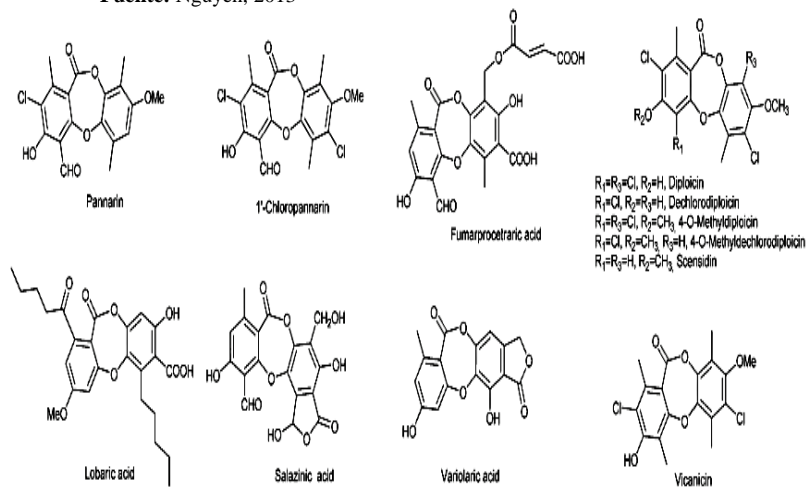


Figura 4-1 Compuestos liquénicos depsidones que actúan como filtros UV
 Fuente: Nguyen 2013

Como se ha detallado anteriormente los metabolitos secundarios líquenes se derivan de tres vías químicas: etilo-vía polymalonato, ruta del ácido shikímico y ruta del ácido mevalónico

La vía de etilo-polymalonato incluye los compuestos liquen más comunes como: ácidos alifáticos secundarios, ésteres y derivados relacionados, compuestos fenólicos mononucleares, dépsidos, tridepsidos y ésteres de bencilo, depsidones y ésteres de difenilo, depsones, dibenzofuranos, ácidos

úsico y derivados antraquinonas y xantonas biogénicamente relacionados cromonas, naftoquinonas y xantonas. La vía del ácido mevalónico incluye esteroides y terpenos. La ruta del ácido shikímico incluye el ácido pulvínico y derivados. (Nguyen, 2013, pp. 7-11)

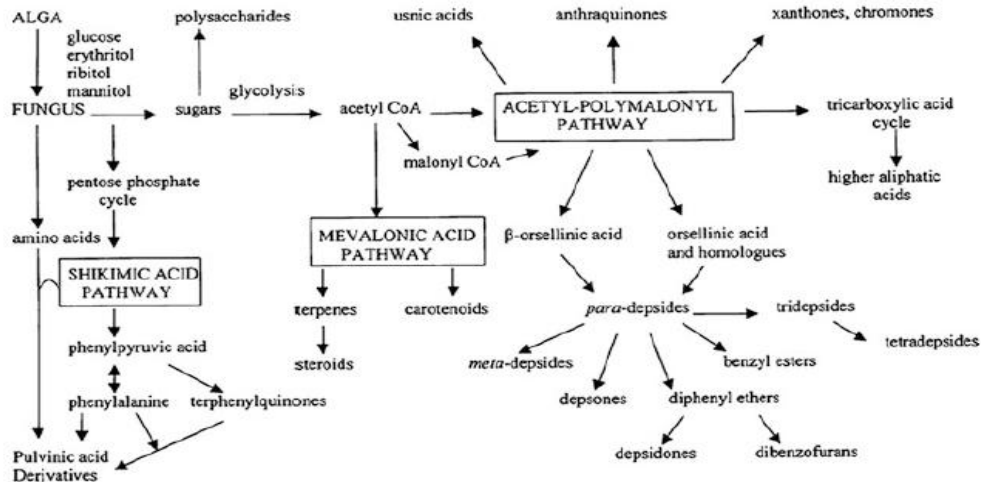


Figura 5-1 Biosíntesis de metabolitos secundarios de líquenes
Fuente: Nguyen 2013

1.3.3 *Parmelina tiliácea*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Lecanoromycetes

ORDEN: Lecanorales

FAMILIA: Parmeliaceae

GENERO: *Parmelina*

ESPECIE: *Parmelina tiliácea*

La especie en mención posee un talo de 5-7 cm, en algunos casos presenta hasta 18 cm o más, sus lóbulos presentan 6-11 mm de ancho, adyacentes y en algunas ocasiones se presentan de tipo solapantes, de aspecto redondeados con orientación hacia el centro. La cara superior es grisácea, con tonalidades blanquecinas, la cara inferior que se conecta al sustrato es de color negro, se pueden visualizar algunas ricinas que en algunas ocasiones pueden distinguirse de las orillas de los lóbulos. Los apotecios se registran en medidas hasta de 6 mm, en ocasiones aún más. (Chicaiza, 2015, pp.41)

1.3.3.1 Estudio fitoquímico en la especie *Parmelina tiliacea*

PRUEBA	DETERMINACIÓN	RESULTADO
Ensayo de sudan	Determinación de aceites y grasas	(+)
Ensayo de Alcaloides	Determinación de Alcaloides	
Ensayo de Dragendorff		(-)
Ensayo de Mayer		(-)
Ensayo de Wagner		(-)
Ensayo de Baljet	Determinación de lactonas y coumarinas	(-)
Ensayo de Liebermann-Buchard	Determina la presencia de Triterpenos y esteroides	(++)

Figura 6-1 Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto etéreo liquénico
Fuente: Janeta, 2015

PRUEBA	DETERMINACIÓN	RESULTADO
Ensayo de Hidroxamato férrico	Determinación de Coumarinas	(-)
Ensayo de Alcaloides	Determinación de Alcaloides	
Ensayo de Dragendorff		(-)
Ensayo de Mayer		(-)
Ensayo de Wahner		(-)
Ensayo de Borntrger	Determinación de Quinolonas	(-)
Ensayo de Liebermann-Buchard	Determina la presencia de Triterpenos y esteroides	(++)
Ensayo de Catequinas		(-)
Ensayo de resinas		(-)
Ensayo de Fehling	Determinación de azúcares reductores	(-)
Ensayo de Espuma	Determinación de Saponinas	(-)
Ensayo de Cloruro Férrico	Determinación de compuestos fenólicos	(+++)
Ensayo de Ninhidrina	Determina presencia de Aminoácidos	(-)

Figura 7-1 Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto etanólico liquénico
Fuente: Janeta, 2015

PRUEBA	DETERMINACIÓN	RESULTADO
Ensayo de Alcaloides	Determinación de Alcaloides	
Ensayo de Dragendorff		(-)
Ensayo de Mayer		(-)
Ensayo de Wahner		(-)
Ensayo de principios amargos		(-)
Ensayo de resinas		(-)
Ensayo de Fehling	Determinación de azúcares reductores	(-)
Ensayo de Espuma	Determinación de Saponinas	(-)
Ensayo de Cloruro Férrico	Determinación de compuestos fenólicos	(+++)
Ensayo de Ninhidrina	Determina presencia de Aminoácidos	(-)

Figura 8-1 Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto acuoso liquénico
Fuente: Janeta, 2015

1.3.4 Datos cromatográficos de compuestos líquénicos

Lichen species	t.l.c.	Lichen products detected	
		Localisation in the thallus	
<i>Cetrelia olivetorum</i>	atranorin* olivetoric acid*	upper cortex; medulla;	K+ yellow C+ pink KC+ red
<i>Parmelia tiliacea</i>	atranorin* lecanoric acid*	upper cortex; medulla;	K+ yellow C+ intense red
<i>Platismatia glauca</i>	atranorin* caperatic acid**	upper cortex; (no reaction seen)	K+ yellow
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	atranorin* physodic acid* two unidentified spots	cortex medulla;	K+ yellow KC+ orange C-

* Phenolic carboxylic acid derivatives; ** higher fatty acid.

Figura 9-1 Compuestos líquénicos de varias especies

Fuente: Honneger 1986

1.3.5 Valores Rf estándar para compuestos líquénicos

Compound	RF in solvent					
	A	B	B'	C	E	G
Atranorin	75	78	73	79	57	—
Chloroatranorin	74	79	73	81	30	—
Usnic acid	70	70	65	71	23	—
4-O-Methylhypo- protocetraric acid	39	58	51	45	—	61
Notatic acid	34	49	44	38	—	55
Norstictic acid	40	29	32	30	—	57
Physodalic acid	10	30	33	19	—	46
Stictic acid	32	9	9	18	—	34
Salazinic acid	10	7	7	4	—	26

Figura 10-1 Valores Rf de compuestos líquénicos

Fuente: John Elix 2014

1.4 Adaptación de los líquenes frente al estrés UV

Los aspectos relacionados a la adaptación de los líquenes frente al estrés UV se puede resumir en lo siguiente: dispersión de la luz, cribado de radiación, disipación térmica, reparación de membrana, activación de la defensa antioxidante. Las estrategias de protección dependen de la anatomía de las estructuras vegetales y el estado de hidratación de los líquenes. . (Khanh-Hung, Nicolas, & Sophie, 2013, pp. 269-275)

Un mecanismo importante en los líquenes es la producción de compuestos que actúan como filtros como los compuestos fenólicos, depsidones, dépsidos, difeniléter, antraquinonas, xantonas u otros derivados del shikimato. (Khanh-Hung, Nicolas, & Sophie, 2013,pp. 269-275)

Estos metabolitos se cristalizan en la superficie de las hifas , ya sea en la corteza superior o en la médula interna , y su acumulación parece ser mayor en las partes superiores. Estos compuestos absorben y re -emiten la radiación UV como fluorescencia o calor. (Khanh-Hung, Nicolas, & Sophie, 2013,pp. 269-275)

1.5 *Escherichia coli*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

REINO: Bacteria

PHYLUM : Proteobacteria

CLASE: Gammaproteobacteria

ORDEN: Enterobacteriales

FAMILIA: Enterobacteriaceae

GENERO: *Escherichia*

ESPECIE: *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo que no forma esporas, miden de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo. Son catalasa positivos y oxidasa negativos. Son capaces de reducir de nitratos a nitritos y producir vitamina B y K. (Khanh-Hung, Nicolas, & Sophie, 2013,pp. 269-275)

1.6 ATCC

ATCC es una organización de recursos biológicos privada cuya misión se centra en la adquisición, la autenticación, la producción, la conservación, el desarrollo y la distribución de los microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales para la investigación en las ciencias de la vida. ATCC (American Type Culture Collection): American Type Culture Collection (ATCC) es un recurso clave para la investigación científica y médica. Es repositorio de la cultura biológica más importante del mundo. (ATCC, 2015, <http://www.atcc.org>)

1.7 Clasificación de los filtros UV

Según el Reglamento (CE) N° 1223/2009 se pueden encontrar filtros UV inorgánicos y orgánicos.

1.7.1 Filtros UV inorgánicos o físicos

Este tipo de filtro actúa reflejando y/o dispersando la radiación UV. Generalmente dentro de este grupo se encuentran los óxidos metálicos, aunque también se usó con este objetivo el talco y silicatos. Estos brindan una mayor protección que los filtros UV orgánicos y debido a que no penetran la piel son menos nocivos. En vista de que este tipo de filtros pueden formar una capa impermeable y blanquecina capaz de tapar los poros de la piel no son muy aceptados por el consumidor. El único filtro UV inorgánico considerado en el Anexo VI del Reglamento Europeo es el dióxido de titanio. (Teruel, 2015, pp. www.mobiroderic.uv.es)

1.7.2 Filtros orgánicos o químicos

Estos filtros captan la energía incidente la misma que es emitida como radiación térmica e inocua para la piel. Son moléculas orgánicas que gracias a su estructura se les confiere un elevado coeficiente de absorción molar en la zona del UV. Presentan la ventaja de que son más fluidas y pueden ser absorbidas por la piel permitiéndola transpirar, de tal manera que son más aceptadas por los consumidores. Una desventaja de su uso es los efectos secundarios reportados debido a su capacidad de penetración. (Teruel, 2015, pp. www.mobiroderic.uv.es).

1.7.3 Filtros químicos UVB

Absorben la luz en el intervalo de 280-320 nm, y su máximo de absorción se sitúa entre 305 y 310nm, es decir, en el máximo de efectividad eritematosa

1.7.3.1 Cinamatos

Son sustancias químicas con las cuales se elaboran filtros solares de amplio espectro con un factor de protección solar igual o superior a 15. Las concentraciones de uso están alrededor del 1% y el 10%. Este tipo de filtro actúan frente a la radiación UVA y UVB. Se utilizan para la prevención de las quemaduras solares, el envejecimiento prematuro de la piel y el cáncer de piel. Otro beneficio del

uso de estos compuestos es la protección a los trastornos de fotosensibilidad originados tras la exposición a radiación UVA y UVB. (Teruel, 2015,pp. www.mobiroderic.uv.es).

1.7.3.2 Derivados del PABA

El octil dimetil paba (octil dimetil-para-aminobenzoato), conocido también como pamidato o escalol 507, es un filtro solar que absorbe un alto porcentaje de los rayos ultravioletas dañinos, productores de quemaduras en la piel, que a la vez le permite el bronceado. (Teruel, 2015,pp. www.mobiroderic.uv.es)

1.8 Antecedentes de la investigación

Son notorias actualmente las diferentes afecciones de la piel como el envejecimiento prematuro, eritemas, carcinomas, melanomas. Por ello se han desarrollado varios estudios a través del uso de compuestos naturales debido a su propiedad para sintetizar compuestos que también las protejan de la radiación. (Goncalves, Souza, & Leite, 2012,pp523-528) Con la finalidad de hallar nuevos activos útiles como foto protectores se han realizado estudios de valoración de foto protección haciendo uso de métodos espectrofotométricos in vitro con el fin de obtener resultados que promuevan la inclusión de dichas sustancias en formulaciones farmacéuticas. (Violante, y otros, 2009,pp.406-410).

Las plantas han respondido al incremento de radiación UVB con la síntesis acumulativa de sustancias filtros UV contra el daño celular. Una especie vegetal de interés para este estudio son los líquenes. Estudios de foto protección en base al uso de compuestos liquénicos no es un área ampliamente investigada. (Solhaug, 2002,pp3130-138)

Boehm y colaboradores en su estudio de estudios foto físicos de nuevos potentes foto protectores da a conocer que las sustancias liquénicos cromóforas por su capacidad de absorción en la zona UVA UVB y UVC pueden ser considerados como candidatos de una nueva generación de protectores solares. (Fritz, Ruth, & Suppiah, 2009,pp.40-45). Los líquenes son especies que pueden sobrevivir en condiciones de alta y baja longitud de onda de luz. Este tipo de radiación es nociva para el hombre ya que llevaría a la formación de oxiradicales. Las propiedades foto-físicas de compuestos poli aromáticos extraídos de los líquenes sugieren que posiblemente poseen propiedades foto protectoras útiles para posteriores investigaciones para valorarlos como foto protectores. (Fritz, Ruth, & Suppiah, 2009,pp.40-45)

En el estudio realizado por Hana Vrablikova y colaboradores se da a conocer que se produce la síntesis de pigmentos corticales como melanina y parietina en los líquenes tras la inducción de radiación UVB. (Hana, Knut, & Yngvar, 2006, pp.151-162). La concentración de dichos pigmentos varía de acuerdo a la estación del año y pues son de uso para la protección del fotobionte durante las épocas de alta radiación solar. (Hana, Knut, & Yngvar, 2006, pp.151-162) Este último trabajo se argumenta también por lo manifestado en Boehm et al ya que cita los líquenes empiezan a sintetizar parietina y melanina como una respuesta frente a la radiación UVB. (Fritz, Ruth, & Suppiah, 2009, pp.40-45) (Hana, Knut, & Yngvar, 2006, pp.151-162)

Se sintetizan también compuestos fenólicos que son producidos por la absorción de la radiación UVB, estos agentes son usados como foto protectores. Nybakken y colaboradores establecen que los líquenes al encontrarse secos en la altura se tornan dependientes de protección UVB por tanto se adjudica dicha actividad a un grupo heterogéneo de sustancias de origen fúngico con diferentes rutas de biosíntesis, conocidos como compuestos liquénicos donde la mayoría de los compuestos liquénicos absorben fuertemente en la región del UV. (Nybakken & Bilger, 2004, pp.130-138)

Los compuestos liquénicos ampliamente distribuidos como parietina, atranorina, ácido úsnico como también aquellos que estructuralmente son poco conocidos son pigmentos corticales que forman una lámina sobre el fotobionte. (Fahselt, 1997, pp. 23-29) Para determinar si un pigmento puede servir como filtro protector García- Pichel y colaboradores han propuesto parámetros como que el compuesto tiene que absorber la radiación; la actividad foto protectora debe ser demostrada *in vivo*; la biosíntesis del producto tiene que incluir una radiación relevante. (Solhaug, 2002, pp. 130-138)

Estudios realizados en líquenes evalúan la capacidad foto protectora de las sustancias tras irradiación en un intervalo de tiempo de dos horas a $60\text{W}/\text{m}^2$ donde se concluye que la presencia del ácido gyrophorico muestra una eficacia del 90% como foto protector. Otros estudios manifiestan además la baja degradación de los compuestos liquénicos tras exposiciones *in vitro* para comprobar la actividad foto protectora. (Françoise, Le Dévéhat, & Céline, 2013, pp.17-28).

En otro estudio haciendo uso de métodos espectrofotométricos se ha comprobado que los compuestos liquénicos, calcyne y ácido úsnico, presentan una absorción y un coeficiente de absorción molar comparable frente a los compuestos foto protectores comerciales. (Fritz, Ruth, & Suppiah, 2009, pp.40-45) Tomando en cuenta los trabajos realizados se ha considerado conveniente aquel realizado por Ávila Acevedo y colaboradores el mismo que hace uso de un método *in vitro*

para la determinación de la actividad foto protectora de extractos de *Buddleja scordioides* basándose en la exposición a la radiación UVB tomando en cuenta la sobrevivencia de colonias bacterianas. (Avila, y otros, 2005,pp.213-221)

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de recolección de la muestra

La recolección del materia vegetal se realizó mediante un muestreo aleatorio simple de aproximadamente 200 g de líquen en la provincia de Bolívar, pueblo de San Miguel, sector Laguatán: S 01° 43'51,139'' W 079° 3'4,402'', a una altura promedio de 2714 msnm

2.2 Lugar de investigación

La investigación se realizó en el laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, localizados en la provincia Chimborazo, cantón Riobamba.

2.3 Descripción botánica

Parmelina tiliacea, es un líquen tipo folioso, cuyos lóbulos son adheridos al sustrato, poseen un talo de 5-7 cm, sus lóbulos de aspecto redondeado con orientación hacia adentro presentan 6-11 mm de ancho, son adyacentes y en algunas ocasiones se presentan de tipo solapantes. La cara superior es de color gris con tonalidades blanquecinas, mientras que la cara inferior unida al sustrato es de color oscuro, en ocasiones se pueden visualizar ricinas en las orillas de los lóbulos. Los apotecios se registran en medidas de hasta de 6 mm, en ocasiones aún más grandes. (Chicaiza, 2015, pp.41)

2.4 Acondicionamiento del material vegetal

Se recogió el líquen procurando dejar de lado las porciones pertenecientes al árbol donde se hallaba, como la corteza. Además se muestreó las porciones de líquen de un tamaño grande, con superficie integra y expuesta al sol. El material vegetal al momento de la recolección se halló seco por lo que se logró tomar porciones líquénicas ausentes de musgo, corteza u otro material extraño.

Seguidamente se lo transportó al laboratorio de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH manteniendo el material recolectado a temperatura ambiente hasta la molienda.

La molienda del material liquénico se realizó en un molino de 100W, donde se obtuvo alrededor de 28g de líquen tras lo cual se sometió a los procesos de extracción.

2.5 Obtención de extracto seco de *Parmelina tiliacea*

El líquen seco previamente molido, 25.02505g, fue colocado en un balón de 500mL al mismo que se añadió 250mL de alcohol potable 96%. Posteriormente, se realizó un proceso de extracción por maceración dinámica a temperatura ambiente por un lapso de 30 minutos haciendo uso del Rota vapor marca Büchi R 110. Transcurrido el tiempo, se decantó el extracto obtenido en un frasco ámbar para nuevamente añadir 250mL de alcohol potable 96% y realizar el mismo proceso para un volumen final de extracto alcohólico de 500mL.

Al extracto alcohólico previamente filtrado se le aplicó un proceso de evaporación al vacío con ayuda del Rota vapor marca Büchi R 110 a una temperatura de 40 grados Celsius y una presión entre -15 a -20 mmHg. Al final del proceso se obtuvo el extracto seco de *Parmelina tiliacea* el mismo que se presenta como un polvo fino de color marrón homogéneo de consistencia sólida (Sharapin, 2000pp.66-69).

2.6 Preparación de subextractos

Se pesó 5mg de extracto seco de *Parmelina tiliacea* los mismos que fueron disueltos en 10mL de cada uno de los solventes para la obtención de soluciones de 2000ppm (2mg/mL). Para la obtención de los subextractos a 200ppm y 20ppm se realizaron diluciones a partir de la solución anterior. La redisolución del extracto seco se realizó mediante agitación magnética por 10 minutos. Seguidamente se centrifugaron los subextractos a 3000rpm por 5 minutos. (Elix, 2014, pp.112-120)

2.7 Cromatografía de capa fina

Cromatografía de capa fina o TLC, es un método de análisis de mezclas mediante la separación de los compuestos. Básicamente la técnica consiste en tres pasos - manchado, el desarrollo, y la visualización. A través de esta técnica cromatográfica se halla el valor de Rf que se utiliza para

cuantificar el movimiento de los compuestos a lo largo de la placa. Rf es igual a la distancia recorrida por la sustancia dividida por la distancia recorrida por el disolvente. Su valor es siempre entre cero y uno (Elix, 2014, pp.112-120). En un mililitro de hexano, cloroformo, acetato de etilo y etanol se disolvieron aproximadamente 10 mg de cada uno de los extractos secos.

Cada uno de los extractos se sometió a agitación magnética por 15 minutos. Para el proceso cromatográfico se utilizaron placas de sílica 60 F254 marca Merk de 10 cm de largo por 5 cm de ancho. Se sembraron 10 µL de cada una de las muestras a 1cm al margen de cada placa. Las fases móviles empleadas fueron: Sistema A TOLUENO: DIOXANO: ACIDO ACETICO (180:45:5), sistema B HEXANO: ETER: ACIDO FORMICO (130:80:20), sistema C TOLUENO: ACIDO ACETICO (170:30) y sistema G TOLUENO: ACETATO DE ETILO: ACIDO FORMICO (139:83:8). (Elix, 2014, pp.112-120)

Posterior al proceso cromatográfico estas fueron secadas al ambiente y observadas en la lámpara UV corto y largo. El revelado de las manchas se realizó con una solución de ácido sulfúrico al 10% en etanol; las placas se secaron al ambiente y se sometieron al calor. Se calcularon los Rf para cada una de las manchas reveladas. (Elix, 2014, pp.112-120)

2.8 Preparación de estándar Mc Farland.

La escala de McFarland es usada para la estandarización de un número aproximado de una suspensión de bacterias tras comparar su turbidez. Un estándar de McFarland se trata de una solución compuesta por cloruro de bario y ácido sulfúrico; la reacción entre estos dos químicos resulta en la producción de sulfato de bario precipitado. Un estándar McFarland es visualmente comparable a una suspensión bacteriana de concentración conocida como se indica a continuación.

McFarland Standard	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Approximate Bacterial Suspension / mL
0.5	0.05	9.95	1.5 × 10 ⁸
1.0	0.10	9.90	3.0 × 10 ⁸
2.0	0.20	9.80	6.0 × 10 ⁸
3.0	0.3	9.7	9.0 × 10 ⁸
4.0	0.4	9.6	1.2 × 10 ⁹
5.0	0.5	9.5	1.5 × 10 ⁹
6.0	0.6	9.4	1.8 × 10 ⁹
7.0	0.7	9.3	2.1 × 10 ⁹
8.0	0.8	9.2	2.4 × 10 ⁹
9.0	0.9	9.1	2.7 × 10 ⁹
10.0	1.0	9.0	3.0 × 10 ⁹

Figura 1-2 Preparación de estándar de Mc Farland
Fuente: Prolab Diagnostics, 2015

Se realizó una curva de calibración con el estándar Mc Farland 1-2-3-4. Seguidamente se preparó el estándar Mc Farland No 0.5 que corresponde a una suspensión bacteriana aproximada de 1.5×10^8 a la cual se midió su absorbancia para su respectivo control de calidad. (DALYNN BIOLOGICALS, 2015, http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf)

2.9 Efecto protector frente a la radiación UVB por muerte celular inducida

Una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) se cultivó en caldo cerebro corazón para su reactivación. El extracto alcohólico blando se redisolvió en cada uno de los solventes propuestos, hexano, acetato de etilo, cloroformo y etanol obteniéndose los diferentes sub-extractos a las concentraciones de 2000 ppm, 200 ppm y 20 ppm. Cada subextracto para analizar fue colocado en un tubo de cuarzo de 1cm de diámetro detrás del cual se ubicó otro tubo de cuarzo conteniendo una suspensión de bacterias de *Escherichia coli* (ATCC 25922) 0.5 McFarland. De tal forma que ambos tubos formaron una unidad experimental. (Avila, y otros, 2005,pp.213-221)

Las unidades experimentales fueron irradiados con una lámpara de UV-B marca Philips, Broadband TL 40w/12 RS a una dosis de irradiación de $0,60 \text{ J / cm}^2$. Se detectó el número de unidades formadoras de colonias sobrevivientes a la radiación UVB sembrando 5 uL de la suspensión bacteriana en agar nutritivo cada 30 minutos por cuatro horas realizando diluciones con solución de cloruro de sodio 0.9 % . Se realizó el presente ensayo por triplicado para cada uno de los subextractos y controles a las concentraciones propuestas anteriormente. (Gonçalves, y otros, 2013,pp.122-127) (Avila, y otros, 2005,pp.213-221)

2.10 Determinación de factor de protección solar (SPF) *in vitro*.

Para la determinación del factor de protección solar se prepararon subextractos hexánico, acetato de etilo, clorofórmico y etanólico a 20 ppm, 100 ppm, 200ppm y 500 ppm. Posteriormente se realizó un análisis espectrofotométrico a longitudes de onda entre 290 a 320 nm, con intervalos de 5 nm con el espectrofotómetro Cole Parmer S-2150, una celda de cuarzo de 1 cm y utilizando cada solvente como blanco para esta determinación. (Sinmaleza, 2015, pp.32)

El cálculo del SPF de los subextractos se obtuvo mediante la ecuación de Mansur propuesta en 1986:

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

Dónde:

- EE (λ) representa el espectro de efecto eritemal.
- I (λ) representa la intensidad del espectro solar
- Abs(λ) representa la absorbancia del producto con protección solar
- CF es el factor de corrección igual a 10

Los valores de EE X I son constantes como se muestra a continuación.

Wavelength (nm)	EE x I (normalized)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
Total	1.0000

EE – erythemal effect spectrum; I – Solar intensity spectrum.

Figura 2-2 Los valores de EE X I preestablecidos
Fuente: Sayre, 1979.

2.11 Análisis estadístico de datos

Los datos del número de unidades formadoras de colonias transformadas en términos de área bajo la curva para cada uno de los subextractos y concentración fueron analizados estadísticamente. El análisis estadístico se llevó a cabo con todos los datos obtenidos por triplicado.

Se aplicó la prueba estadística de normalidad de Shapiro Wilk, prueba estadística de homogeneidad de varianza de Levene con posterior aplicación de Anova de un factor y prueba de Tukey en cada

una de las concentraciones propuestas haciendo uso del programa estadístico IBM SPSS STATISTICS 21 para la valoración de la actividad fotoprotectora.

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Extracto seco

A partir de 25.0205 g de liquen seco se obtuvo un peso de extracto seco de 4.6967g; por tanto, el rendimiento de extracción mediante maceración dinámica corresponde a 23.98%.

3.2 Cromatografía en capa fina


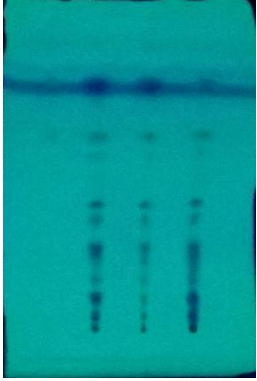
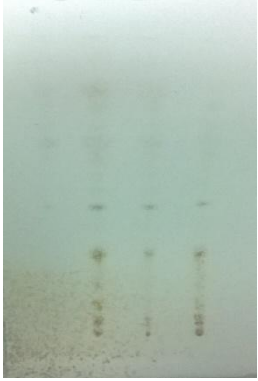
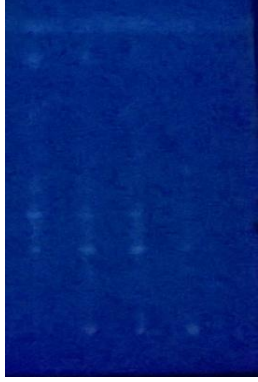
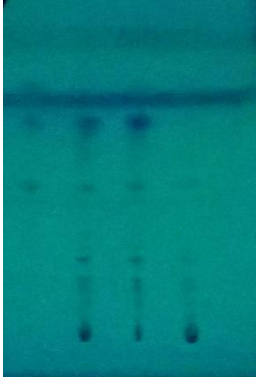

Se realizó la cromatografía del extracto seco mediante diferentes sistemas de solventes con el fin de separar el mayor número de compuestos que podrían ser aquellos identificados por el Rf descrito por John Elix en la figura 3. Esto debido a que cada sistema de solvente mantiene una polaridad distinta lo que permite la separación de varios compuestos.


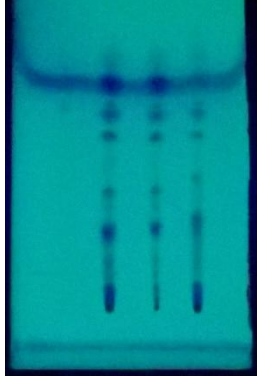
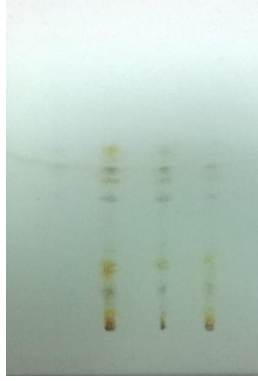

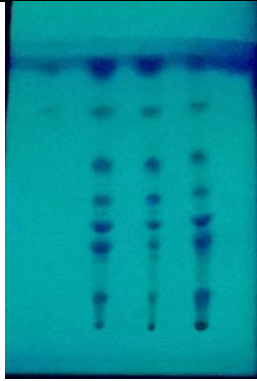

Otro motivo del uso de varios sistemas es que existen compuestos con valores relativamente bajos de Rf en uno u otro sistema; por tanto, el estudio con varios sistemas de solvente permite el análisis de dichos compuestos como depsidones β - orcinol, ácidos secalónico y triterpenoides hopane. Los sistemas de solvente propuestos son específicos para compuestos liquénicos, de allí, que las placas cromatográficas muestran eficacia, eficiencia y resolución. Claramente el sistema C y G muestran mejores parámetros cromatográficos.

En los sistemas A y B se han localizado manchas a través del Rf las cuales podrían tratarse de atranorina y ácido physodálico en cada uno de los subextractos. Los sistemas C y G de igual forma revelan la probable presencia de ácido physodálico, salazínico y estictico. Posiblemente el ácido notático y norestictico han podido también ser identificados mediante los diferentes sistemas propuestos. En las tablas 2-5 hasta 4-5 se indican los Rf obtenidos por cromatografía de capa fina para cada uno de los subextractos en los diferentes sistemas de solvente los mismos que se han comparado frente a los datos proporcionados por John Elix en su Catálogo estandarizado de datos cromatográficos para sustancias liquénicas (Elix, 2014, pp.112-120).

En el estudio realizado por Janeta en el año 2015 sobre la misma especie líquénica constan varios valores de Rf en cada uno de los sistemas cromatográficos los mismos que son comprobables con los obtenidos en el presente estudio. En especial se ha realizado la comparación de resultados de los Rf de las tablas 2-5 hasta 4-5 para corroborar la probable existencia de los compuestos allí descritos.

Tabla 1-3 Cromatografía de capa fina de subextractos líquénicos

FASE MOVIL	ONDA CORTA	ONDA LARGA	REVELADO H ₂ SO ₄ 10%
A TOLUENO: DIOXANO: ACIDO ACETICO (180:45:5)	 1 2 3 4	 1 2 3 4	 1 2 3 4
B ETER:ACIDO FORMICO (130:80:20)	 1 2 3 4	 1 2 3 4	 1 2 3 4

<p>C TOLUENO: ACIDO ACETICO(170:30)</p>			
<p>G TOLUENO:ACETATO DE ETILO: ACIDO FORMICO (139:83:8)</p>			

Realizado por: Javier Urbina, 2015

1: Subextracto hexánico 2: Subextracto de acetato de etilo 3: Subextracto clorofórmico 4: Subextracto etanólico

Tabla 2-3 Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente A

Ácido norestético	Subextracto Hexánico Rf:42.86
	Subextracto de acetato de etilo Rf: 42.86
	Subextracto clorofórmico Rf: 42.86
	Subextracto etanólico Rf: 42.86
Ácido physodálico	Subextracto de acetato de etilo Rf: 10.39
	Subextracto etanólico Rf: 9.09
Atranorina	Subextracto de acetato de etilo Rf: 75.32
	Subextracto clorofórmico Rf: 75.97
	Subextracto etanólico Rf: 75.97
Ácido vulpínico	Subextracto acetato de etilo Rf: 81.82
Distancia de migración de solvente. 7.70cm	

Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 3-3 Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente B

Atranorina	Subextracto hexánico Rf: 72.46
	Subextracto de acetato de etilo Rf: 73.91
	Subextracto clorofórmico Rf: 73.91
Ácido Notático	Subextracto hexánico Rf: 49.28
	Subextracto de acetato de etilo Rf: 50.00
	Subextracto clorofórmico Rf: 50.00
	Subextracto etanólico Rf: 52.17
Ácido physodálico	Subextracto hexánico Rf: 31.88
	Subextracto de acetato de etilo Rf: 31.16
	Subextracto clorofórmico Rf: 30.43
Distancia de migración de solvente: 6.90	

Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 4-3 Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente C

Ácido salizínico	Subextracto de acetato de etilo Rf: 5.06
	Subextracto clorofórmico Rf: 5.06
	Subextracto etanólico Rf: 5.06
Ácido physodálico – Acido estíctico	Subextracto de acetato de etilo Rf: 20.25
	Subextracto clorofórmico Rf: 21.52
	Subextracto etanólico Rf: 22.15
Ácido norestíctico	Subextracto de acetato de etilo Rf: 27.22
	Subextracto clorofórmico Rf: 27.85
Ácido protocetrárico	Subextracto de acetato de etilo Rf: 44.94
	Subextracto clorofórmico Rf: 44.94
Distancia de migración del solvente: 7.90cm	

Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 5-3 Resultados de Cromatografía en capa fina Sistema de solvente G

Ácido salizínico	Subextracto de acetato de etilo Rf: 26.62
	Subextracto clorofórmico Rf: 27.27
Ácido physodálico	Subextracto etanólico Rf: 28.57

	Subextracto hexánico Rf: 42.86
Ácido estíctico	Subextracto de acetato de etilo Rf: 33.12
	Subextracto clorofórmico Rf: 33.77
	Subextracto etanólico Rf: 35.06
Ácido Notático	Subextracto de acetato de etilo Rf:54.55
	Subextracto clorofórmico Rf:54.55
Ácido protocetrárico	Subextracto de acetato de etilo Rf:61.69
	Subextracto hexánico Rf: 60.39
Ácido vulpínico	Subextracto etanólico Rf: 90.91
Distancia de migración del solvente 7.70cm	

Realizado por: Javier Urbina, 2015

3.3 Curva de calibración estándar Mc Farland

No Mc Farland	Absorbancia
1	0.171
2	0.380
3	0.579
4	0.774
X	0.083

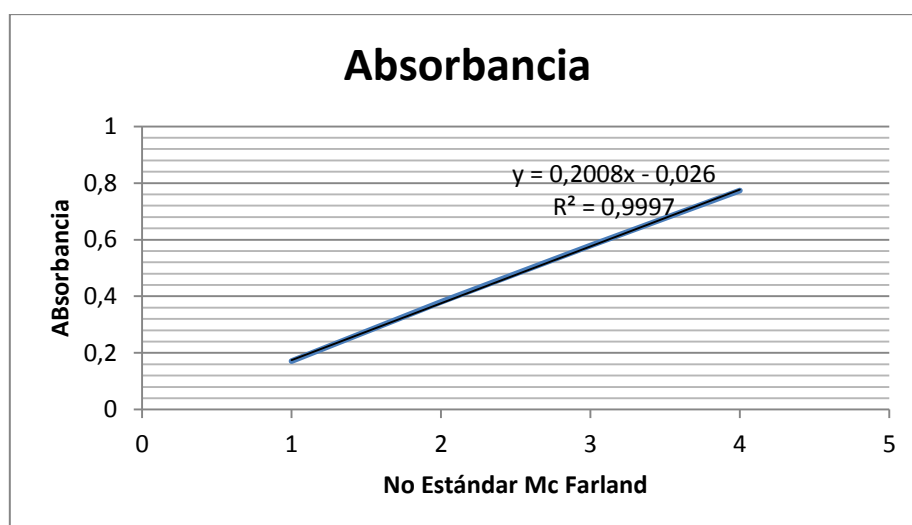


Figura 1-3 Curva de calibración del estándar Mc Farland

Realizado por: Javier Urbina, 2015

$$Y = A + BX$$

Y: Absorbancia

X: No Estándar Mc Farland

La absorbancia de la muestra es 0.083 el mismo que al ser remplazado en la ecuación de la recta nos da el valor de 0.54. La absorbancia para un tubo Estándar Mc Farland 0.5 oscila entre 0.8-1.0 (DALYNN BIOLOGICALS, 2015, http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf); de tal forma que la turbidez mostrada por el tubo 0.5 Mc Farland refleja aproximadamente una concentración de colonias bacterianas de 1.5×10^8

3.4 Efecto de protección solar método de muerte celular inducida

Tabla 6-3 Efecto fotoprotector subextracto de acetato de etilo

TIEMPO (h)	2000 ppm UFC	200 ppm UFC	20 ppm UFC	BLANCO UFC
0	38300(±173)	38733(±681)	38233(±58)	38200
0,5	9233(±351)	3800(±700)	3200(±100)	2800
1	1733(±306)	533(±58)	300(±0)	150
1,5	467(±58)	183(±29)	67(±29)	30
2	200(±50)	117(±29)	23(±3)	1
2,5	117(±29)	75(±25)	15(±0)	0
3	98(±11)	72(±11)	8(±3)	0
3,5	62(±22)	8(±2)	5(±2)	0
4	4(±7)	3(±4)	3(±3)	0

Realizado por: Javier Urbina, 2015

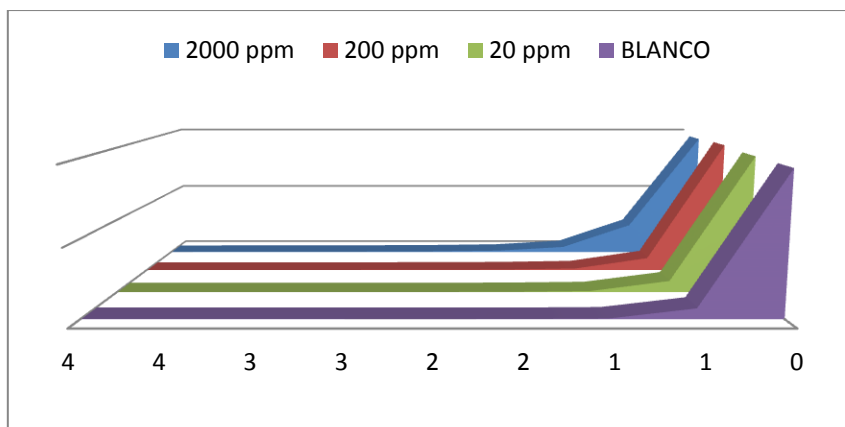


Figura 2-3 Efecto fotoprotector subextracto de acetato de etilo
Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 7-3 Efecto fotoprotector subextracto hexánico

TIEMPO (h)	2000 ppm UFC	200 ppm UFC	20 ppm UFC	BLANCO UFC
0	35433(±577)	36767(±231)	36767(±231)	39000(±1559)
0,5	15400(±755)	8467(±1193)	7000(±624)	6100
1	4167(±907)	1333(±153)	833(±252)	600
1,5	1260(±386)	633(±58)	133(±58)	100
2	567(±153)	172(±26)	65(±30)	20
2,5	225(±66)	52(±3)	23(±23)	15
3	104(±41)	5(±0.5)	2(±0.5)	0
3,5	47(±37)	1	0(±0.5)	0
4	2(±3)	0	0	0

Realizado por: Javier Urbina, 2015

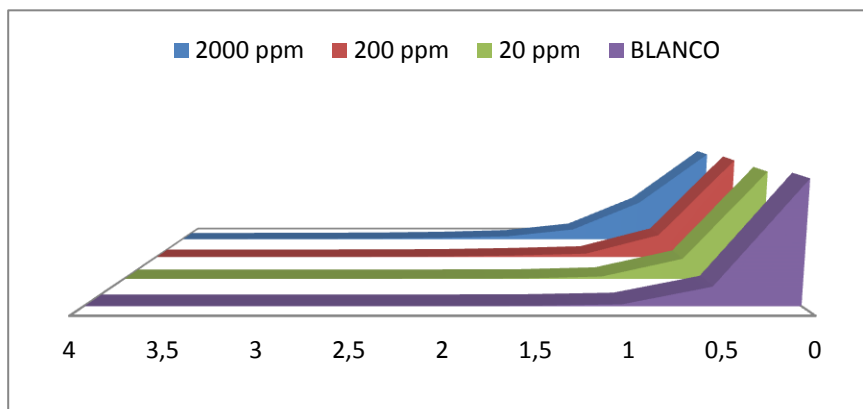


Figura 3-3 Efecto fotoprotector subextracto hexánico I, II, III

Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 8-3 Efecto fotoprotector subextracto etanólico

TIEMPO (h)	2000 ppm UFC	200 ppm UFC	20 ppm UFC	BLANCO UFC
0	40067(±808)	40067(±808)	40067(±808)	38200
0,5	19867(±3592)	8233(±757)	5367(±416)	2000
1	8600(±794)	3533(±252)	500(±100)	300
1,5	2867(±586)	217(±76)	233(±29)	0
2	283(±58)	92(±14)	62(±21)	0
2,5	75(±25)	50(±0,5)	22(±8)	0
3	11(±3)	2(±2)	6(±1)	0
3,5	2(±1)	1(±0,5)	1	0
4	0(±1)	1(±1)	1	0

Realizado por: Javier Urbina, 2015

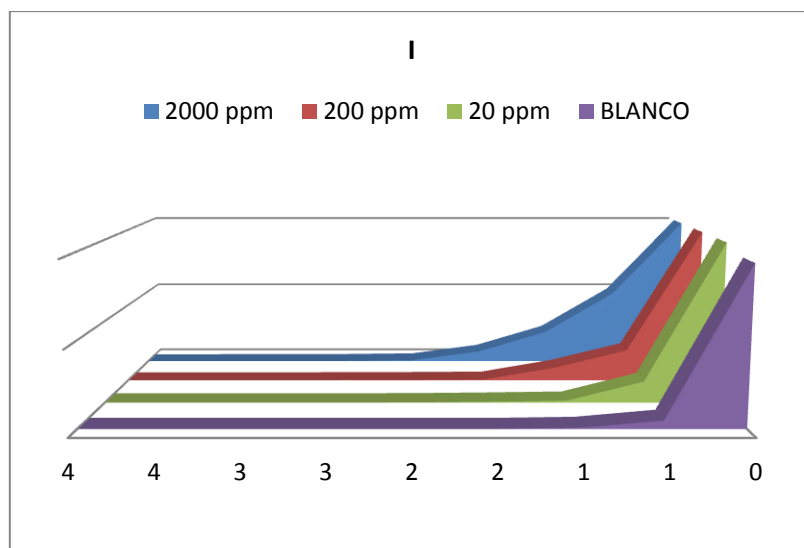


Figura 4-3 Efecto fotoprotector subextracto etanólico I, II, III

Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 9-3 Efecto fotoprotector subextracto clorofórmico

TIEMPO (h)	2000 ppm UFC	200 ppm UFC	20 ppm UFC	BLANCO UFC	
0	42600(±1836)	41600(±954)	41533(±907)	38467(±981)	
0,5	10600(±1217)	6067(±611)	2127(±379)	2100	
1	1833(±351)	600(±265)	533(±153)	500	
1,5	683(±76)	233(±29)	183(±29)	150	
2	333(±29)	150(±0.5)	117(±29)	90	
2,5	167(±76)	73(±18)	50(±5)	15	
3	108(±35)	7(±2)	4(±1)	2	
3,5	1(±1)	1(±1)	1	1	
4		0	0	1(±1)	0

Realizado por: Javier Urbina, 2015

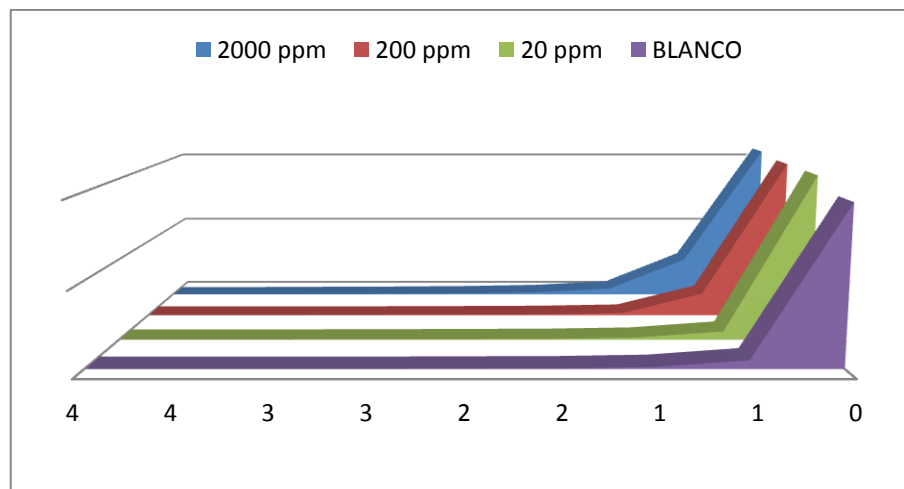


Figura 5-3 Efecto fotoprotector subextracto clorofórmico I, II, III

Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 10-3 Efecto fotoprotector Octilmetoxycinamato

TIEMPO (h)	2000 ppm UFC	200 ppm UFC	20 ppm UFC	BLANCO UFC
0	40133(±971)	40133(±971)	40133(±971)	38200
0,5	10033(±874)	7733(±503)	6100(±458)	1300
1	1867(±351)	533(±58)	350(±50)	300
1,5	467(±208)	383(±58)	200(±0.5)	50
2	200(±87)	77(±3)	35(±22)	7
2,5	100(±0.5)	25(±0.5)	12(±8)	0
3	10(±9)	5(±2)	1(±1)	0
3,5	2(±1)	0(±1)	0(±1)	0
4	1	0	0	0

Realizado por: Javier Urbina, 2015

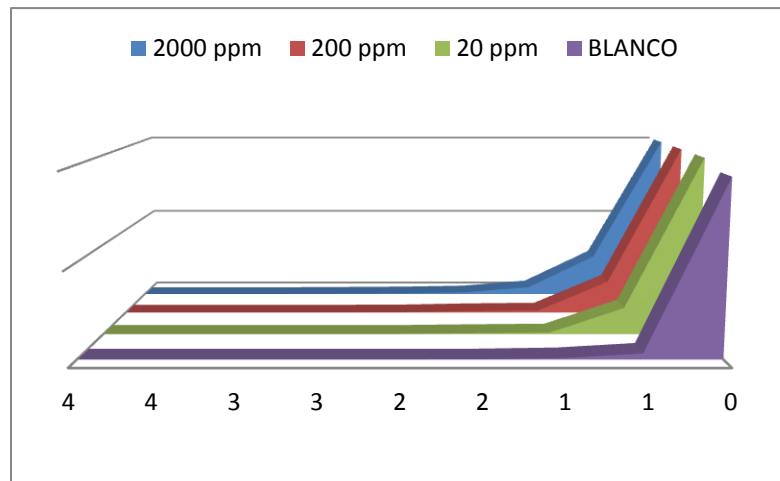


Figura 6-3 Efecto fotoprotector octilmetoxycinamato I, II, III

Realizado por: Javier Urbina, 2015

Tabla 11-3 Efecto fotoprotector pamidato

TIEMPO (h)	2000 ppm UFC	200 ppm UFC	20 ppm UFC	BLANCO UFC
0	39433(±404)	39433(±404)	39533(±462)	38200
0,5	10600(±361)	9033(±416)	7100(±500)	1300
1	1100(±200)	767(±58)	600(±100)	300
1,5	250(±50)	58(±14)	53(±6)	50
2	55(±10)	17(±8)	12(±3)	7
2,5	12(±3)	5(±1)	2(±2)	0
3	1(±1)	2(±1)	0	0
3,5	2(±1)	0	0	0
4	0(±1)	0	0	0

Realizado por: Javier Urbina, 2015

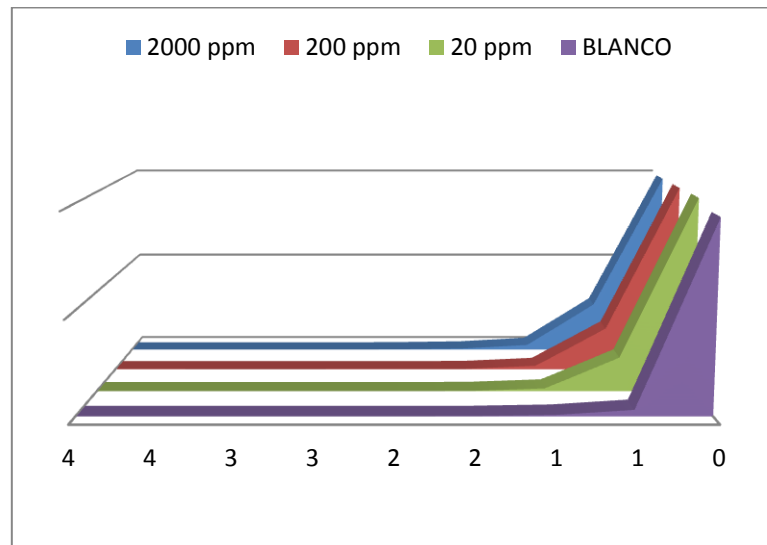


Figura 7-3 Efecto fotoprotector pamidato I, II, III

Realizado por: Javier Urbina, 2015

3.5 Área bajo la curva de subextractos y controles

Tabla 12-3 Valores de área bajo la curva de subextractos y controles.

SUBEXTRACTO	20 ppm	200 ppm	2000 ppm
	ABC	ABC	ABC
ETANOL	2412,08(±1.89)	5381,00(±514.05)	15168,92(±1144.46)
ETHYL ACETATO	327,17(±60.20)	1037,67(±216.57)	4490,83(±339.54)
CLOROFORMO	781,83(±241.58)	2920,00(±396,75)	6467,17(±231.79)
HEXANO	53,00(±16.52)	1355,33(±246.61)	6576,00(±404.97)
OMC	3003,67(±486.80)	4033,17(±490.53)	5994,08(±800.65)
PAMIDATO	3388,67(±123.04)	4421,00(±323.96)	5489,75(±204.50)

Realizado por: Javier Urbina, 2015

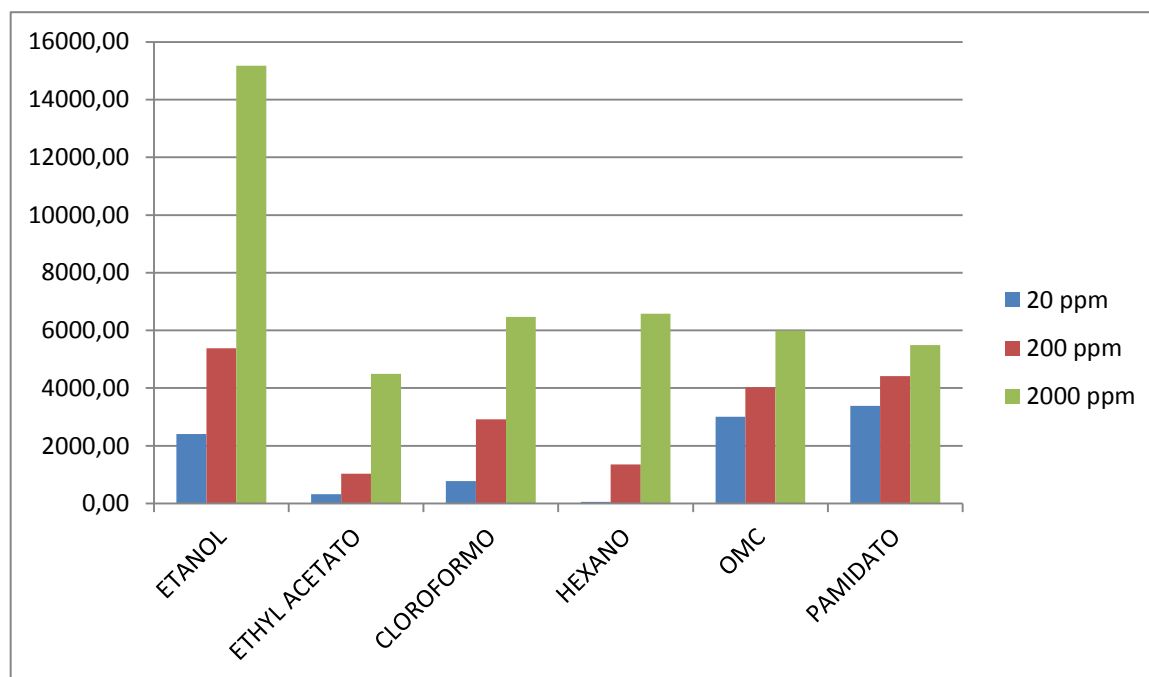


Figura 8-3 Valores de área bajo la curva de subextractos y controles

Realizado por: Javier Urbina, 2015

El número de unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* sobrevivientes tras la aplicación del método de muerte celular inducida por radiación UVB se representa a través de valores de área bajo la curva (ABC) para cada uno de los factores a considerar; tipo de subextracto y concentración.

El valor del área bajo la curva (ABC) indica la magnitud de la sobrevivencia de cepas de *E. coli* gracias a la acción fotoprotectora de cada uno de los subextractos y controles en estudio. De tal forma que a través del valor del ABC se infiere la capacidad fotoprotectora de cada sustancia. Por tanto, un mayor valor de ABC significa que existió mayor sobrevivencia bacteriana tras la exposición a la radiación UVB

3.5.1 20 ppm

El valor estadístico F obtenido tras aplicación del test estadístico de Anova de un factor sugiere que existe al menos un subextracto cuya ABC es estadísticamente diferente a la de los otros subextractos y controles.

Una comparación entre subextractos refleja que el subextracto etanólico posee un efecto fotoprotector mayor frente a los subextractos clorofórmico, acetato de etilo y hexánico con un área bajo la curva promedio de 2412.08. Mientras que entre el extracto clorofórmico y acetato de etilo no existe una diferencia estadísticamente significativa al igual que entre subextractos hexánico y de acetato de etilo. El subextracto clorofórmico muestra un efecto fotoprotector mayor que el subextracto hexánico. En contraste con los fotoprotectores usados como controles en el ensayo indican que ambos poseen un efecto fotoprotector mayor que los subextractos en estudio con excepción de la comparación entre el OMC y el subextracto etanólico donde no existe una diferencia estadísticamente significativa.

3.5.2 200 ppm

Con un área bajo la curva de 5381 el subextracto etanólico a 200ppm posee un efecto fotoprotector mayor que los subextractos y el control OMC con un ABC de 4033,16. Cuando se compara el subextracto etanólico frente al pamidato el efecto de protección a la radiación UVB por el subextracto etanólico es mayor pero no estadísticamente significativo.

El subextracto clorofórmico con un área bajo de la curva de 2920 ejerce un efecto fotoprotector mayor que el subextracto acetato de etilo y hexánico, resultado estadísticamente comprobado al mostrarse diferencia significativa con estos últimos. Si bien el extracto hexánico presenta un ABC promedio de 1355,33 mayor que el área bajo la curva del subextracto acetato de etilo (1037,66) no existe entre ellos una diferencia significativa. Ambos controles muestran su efecto fotoprotector

con ABC de 4033,16 y 4421 para OMC y Pamidato respectivamente. Estos valores indican un mejor efecto fotoprotector que los subextractos hexánico, clorofórmico y de acetato de etilo a 200ppm.

3.5.3 2000ppm

A 2000 ppm el efecto de protección frente a la radiación UVB del subextracto etanólico es superior y estadísticamente significativo que los subextractos y controles empleados ya que muestra un ABC de 15168.91. Entre los subextractos clorofórmico y hexánico no existe una diferencia estadísticamente significativa puesto que sus valores de ABC son cercanos; sin embargo ambos muestran superioridad en la valoración del efecto fotoprotector al subextracto de acetato de etilo que presenta un ABC de 4490.83.

A la concentración estudiada en este caso se observa que no existe una diferencia significativa entre el efecto de protección frente a la radiación UVB otorgado por los controles y los subextractos de acetato de etilo, hexano y cloroformo. Por tal motivo el efecto fotoprotector entre estos últimos es comparable a 2000ppm

En todas las gráficas que se muestran a continuación se verifica la disminución del número de unidades formadoras de colonias bacterianas en función del tiempo. Se puede establecer diferencias entre cada una de las curvas de los diferentes sub-extractos y controles tomando en cuenta la pendiente de cada una de ellas respecto al tiempo.

Haciendo énfasis en el punto de 5000 UFC, el sub-extracto etanólico alcanza dicho punto aproximadamente a los 75 minutos tras exposición a la radiación, mientras que el sub-extracto hexánico lo alcanza a la media hora de exposición y tanto controles como subextractos clorofórmico y acetato de etilo aproximadamente a los 30-40 minutos. Por tanto, el efecto fotoprotector del sub-extracto etanólico es 1.6 veces mayor que el hexánico y 2.14 respecto a controles y demás subextractos a 2000 ppm.

A 200 ppm tanto subextractos como controles experimentan una disminución similar en cuanto al número de UFC en los primeros minutos de radiación. Sin embargo al cabo del tiempo empiezan a notarse diferencias por tanto el tiempo al cual se alcanza las 5000 UFC es variable de una a otro.

El subextracto etanólico, hexánico, OMC y pamidato aproximadamente a 40 minutos llegan a dicho valor mientras que el subextracto clorofórmico a 30 minutos y de acetato de etilo aproximadamente a 25 minutos tras exposición a la radiación. A 20 ppm se observa la prevalencia de ambos controles respecto a los sub-extractos en estudio ya que estos últimos experimentan una disminución de UFC más pronunciada que el OMC y pamidato. Todos los subextractos en esta concentración pierden su efecto fotoprotector en menos de una hora de exposición a la radiación UVB

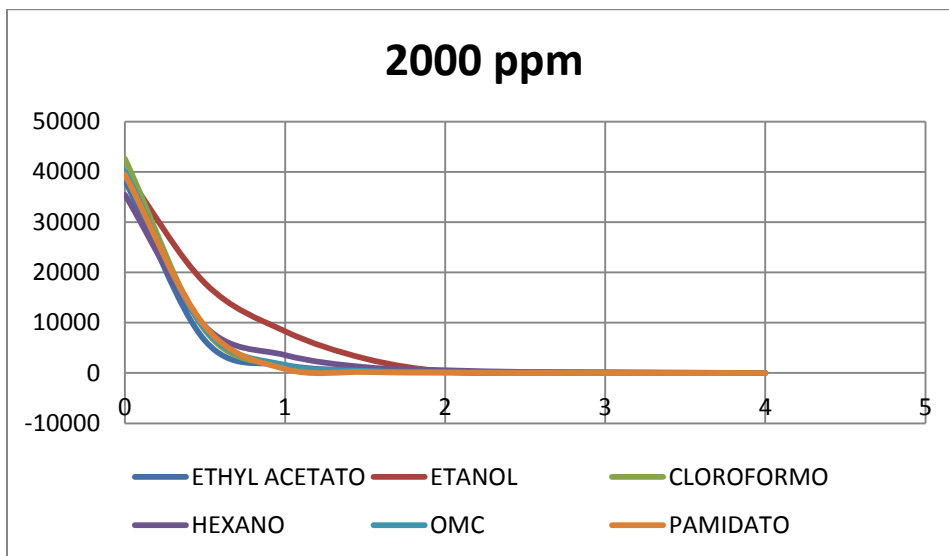


Figura 9-3 Unidades formadoras de colonia de *E.coli* vs tiempo 200ppm
Realizado por: Javier Urbina, 2015

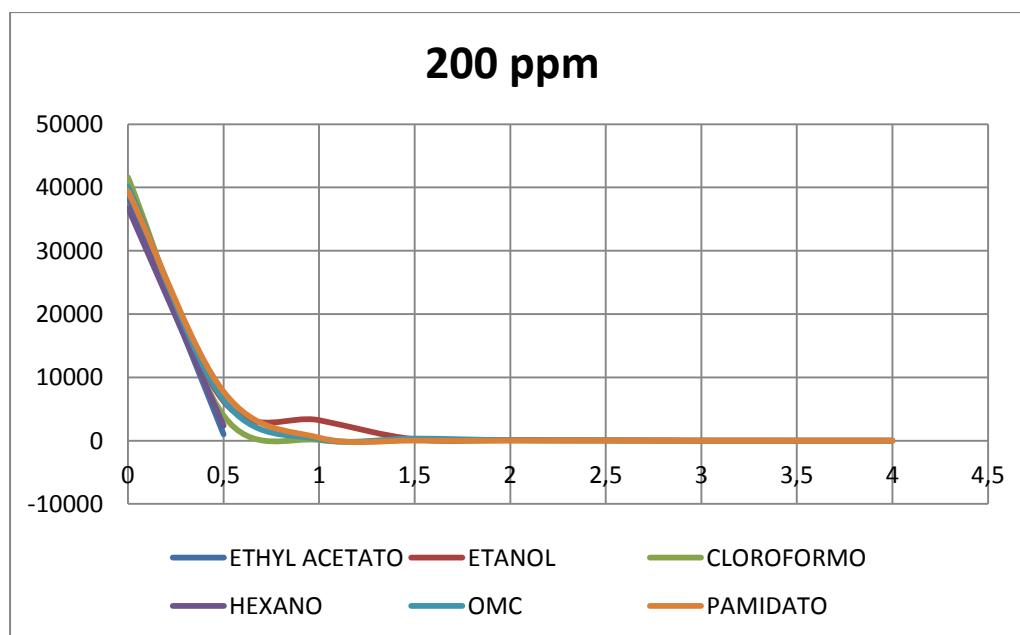


Figura 10-3 Unidades formadoras de colonia de *E.coli* vs tiempo 200ppm
Realizado por: Javier Urbina, 2015

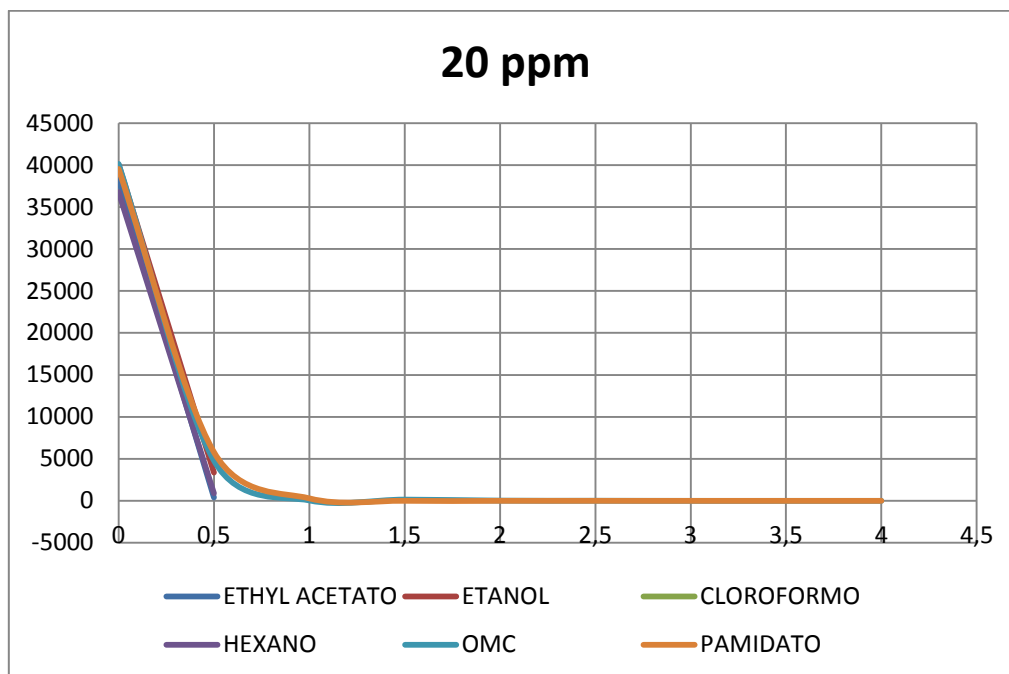


Figura 11-3 Unidades formadoras de colonia de E.coli vs tiempo 20ppm
 Realizado por: Javier Urbina, 2015

3.6 Factor de protección solar

El factor de protección solar se calculó haciendo uso de la ecuación de Mansur. Es notorio que en cada uno de los subextractos el valor del FPS aumenta de forma proporcional a la concentración lo cual se puede evidenciar en los valores del ABC los mismos que aumentan gradualmente con la concentración de cada subextracto.

Tomando como punto de comparación la concentración de 200 ppm para cada uno de los subextractos el etanólico es aquel cuyo FPS promedio es superior con 12.07 seguido del subextracto clorofórmico con un 9.17, acetato de etilo 7.79 y hexano con 1.98. Ha sido posible la determinación del FPS hasta 500 ppm de hexano y cloroformo mientras que para acetato de etilo y etanol el método utilizado ya no es aplicable puesto que los valores de absorbancia emitidos por el espectro fotómetro se vuelven constantes.

Tabla 13-3 Factor de protección solar de subextractos

FACTOR DE PROTECCION SOLAR				
	20 ppm	100 ppm	200 ppm	500 ppm
HEXANO	0,18(±0.02)	1,3(±0.05)	1,98(±0.07)	4,51(±0.01)
ETIL	0,98(±0.13)	5(±0.01)	7,79(±0.25)	
ACETATO				
CLOROFORMO	0,38(±0.04)	4,85(±0.03)	9,17(±0.47)	15,61(±0.05)
ETANOL	1,63(±0.05)	6,91(±0.01)	12,07(±0.13)	

Realizado por: Javier Urbina, 2015

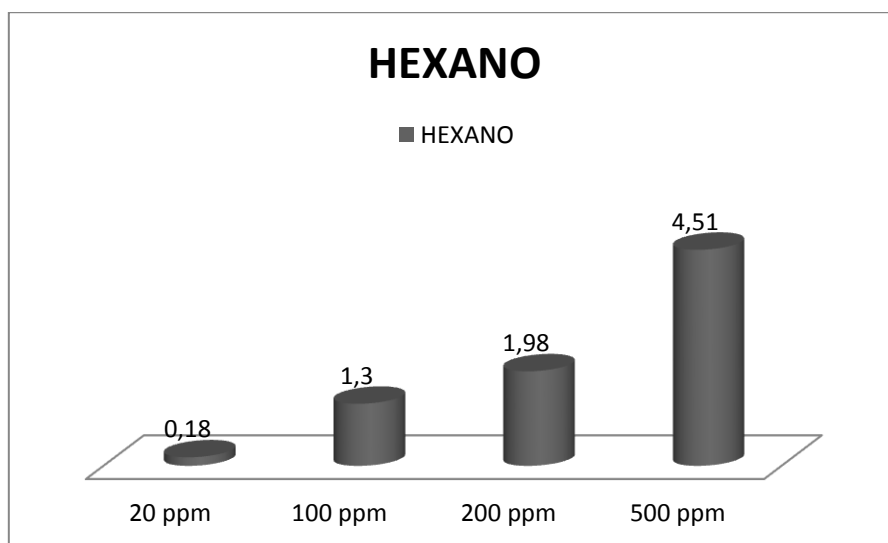


Figura 12-3 Factor de protección solar subextracto hexánico

Realizado por: Javier Urbina, 2015

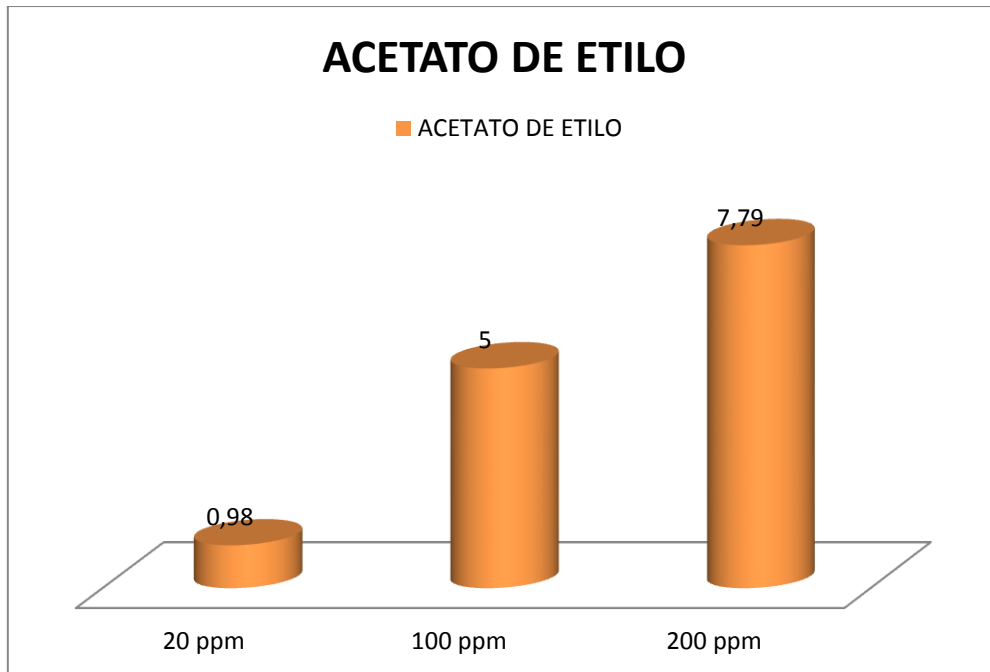


Figura 13-3 Factor de protección solar subextracto de acetato de etilo
 Realizado por: Javier Urbina, 2015

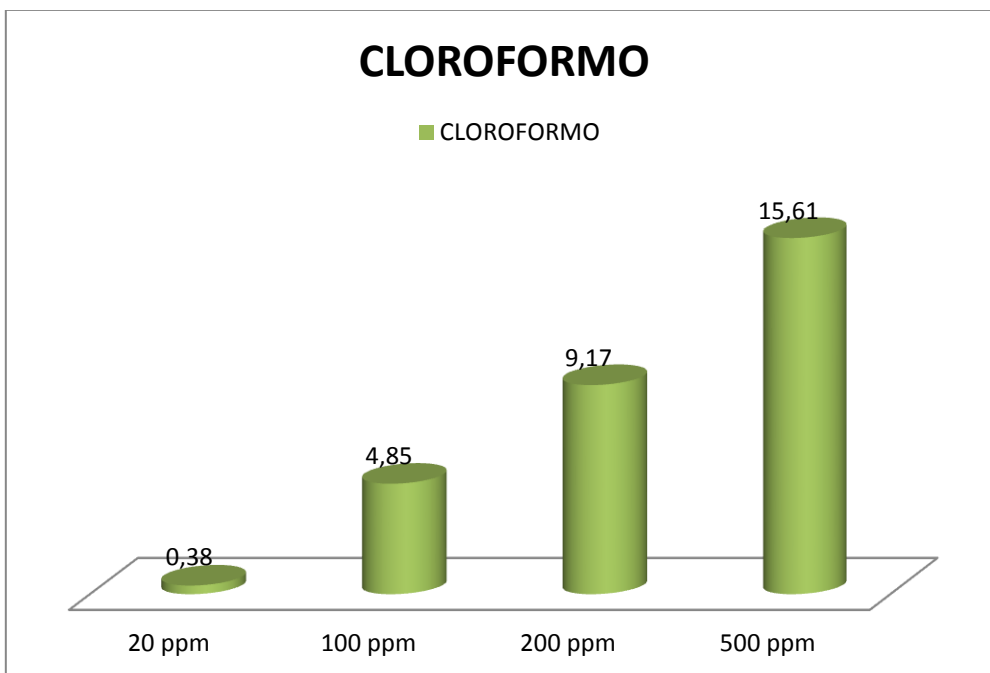


Figura 14-3 Factor de protección solar subextracto clorofórmico
 Realizado por: Javier Urbina, 2015

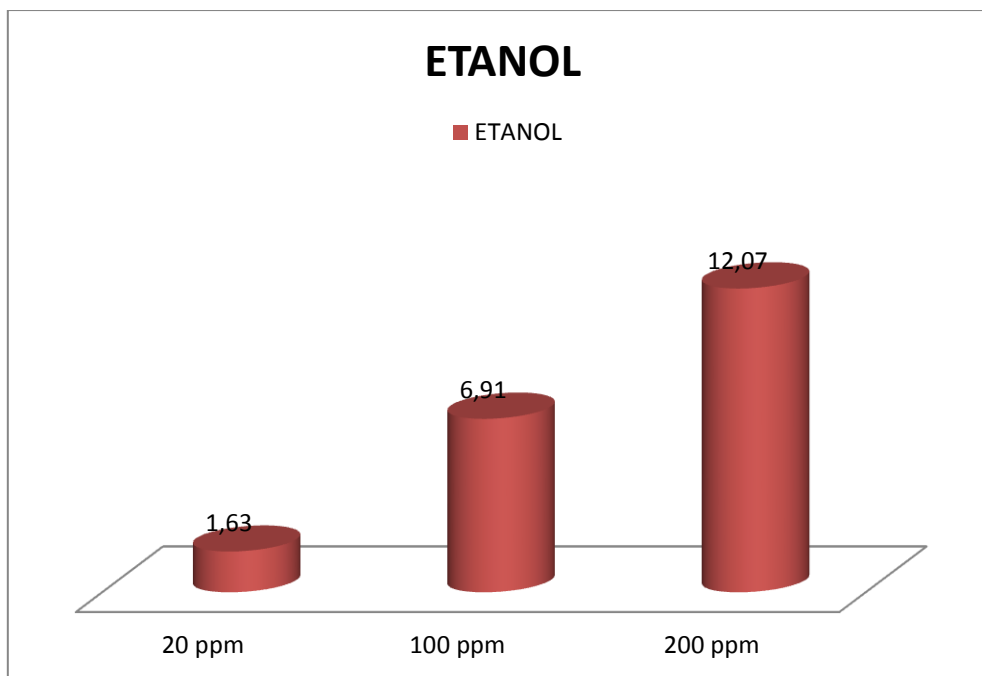


Figura 15-3 Factor de protección solar subextracto etanólico
Realizado por: Javier Urbina, 2015

Los resultados obtenidos para la valoración del efecto fotoprotector, factor de protección solar y la cromatografía de capa fina realizada a los diferentes subextractos se corroboran con datos bibliográficos. Han sido reportados como filtros UV los compuestos liquenáceos dépsidos, entre ellos la atranorina, ácido difractaico, ácido divaricático, ácido gyrophorico.

Es evidente la posible presencia de atranorina en el líquen en estudio (HONEGGER, 1986) . Este compuesto es biosintetizado por el líquen ante altas intensidades de luz, tal como se refleja en el estudio realizado en la especie *Cladonia rangiferina* (Khanh, Nicolas, & Sophie, 2013). De tal forma que las condiciones al momento de la recolección del material de estudio apoyan la presencia de dicho compuesto. Estudios comparativos entre especies expuestas a la luz solar y otras cubiertas de la misma reflejan el rol biológico del compuesto como filtro UV.

Los valores del factor de protección solar de los subextractos en estudio son menores que los mostrados por los controles cuyo SPF a 200 ppm fue de 17,14 y 20,08 para el OMC y pamidato respectivamente; sin embargo el subextracto etanólico presentó un considerable efecto fotoprotector como ha sido detallado previamente. Los compuestos dépsidos muestran un factor de protección solar bajo y moderado tanto *in vivo* como *in vitro*. (Khanh, Nicolas, & Sophie, 2013) De tal forma que los resultados mostrados en el presente proyecto son comparables.

Otros estudios en especies liquenáceas muestran un SPF para el ácido gyrophorico sobre 5 al igual que extractos de la especie *Lasallia pustulata* donde sus propiedades fotoprotectoras se modifican ligeramente tras una radiación de 2 horas (Françoise, Le Dévéhat, & Céline, 2013, pp. 17-28). El subextracto etanólico analizado a 2000ppm es aquel que mediante el ensayo aplicado muestra una actividad fotoprotectora de consideración hasta aproximadamente dos horas de radiación

Otros estudios realizados a especies liquénicas afirman que los compuestos que han analizado *in vitro* ofrecen un efecto fotoprotector mayor o similar al del OMC al igual que algunos resultados presentados en la presente investigación. (Fiorenza, Kirsten, Cecilia, & Helmut, 2002, pp-133-139)

Estructuralmente, se manifiesta que a medida que más unidades de orto orcinol posea la molécula el SPF aumenta, es así que el ácido gyrophorico al poseer tres unidades muestra un SPF más alto. Otra razón por la cual el subextracto etanólico muestra una propiedad fotoprotectora mejor es debido al solvente; ya que se manifiesta que los solventes polares, metanol o etanol, pueden influir significativamente en los perfiles de fotoprotección de los compuestos. (Khanh, Nicolas, & Sophie, 2013, pp269-275)

Como se muestra en bibliografía, los dépsidos y depsidonas muestran bandas de máxima absorción dentro de la región del UVB comprendida entre 280-315 nm pudiendo utilizarse como filtros UVB ya que su coeficiente de extinción molar es superior a $10000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ lo que es tomado como criterio para establecer un filtro UV. (Françoise, Le Dévéhat, & Céline, 2013, pp. 17-28).

Características estructurales de las depsidonas en comparación a los dépsidos brindan la capacidad a estos para absorber radiación UVB y UVA. Una unidad de orto-hidroxi-benzaldehído en la molécula puede cambiar las características espectrales de la misma; es así que algunos compuestos como el ácido salizínico absorben en longitudes de onda corta, 308-321nm debido a puentes de hidrógeno.

CONCLUSIONES

1. Se determinó la capacidad fotoprotectora *in vitro* de los diferentes subextractos observando que el poder fotoprotector es proporcional a la concentración de extracto liquénico empleado; siendo el subextracto etanólico de *Parmelina tiliacea* el que presenta mejor propiedad fotoprotectora en cada una de las concentraciones analizadas frente a los subextractos hexánico, acetato de etilo y clorofórmico. Cabe añadir que se determinó que a la concentración de 2000 ppm todos los subextractos estudiados mostraron un efecto fotoprotector comparable con los controles OMC y pamidato, reflejándose sus propiedades como filtros UVB.
2. Se obtuvo el factor de protección solar (FPS) *in vitro* para cada uno de los subextractos en estudio, presentándose proporcionales a la concentración, de manera que el subextracto etanólico es aquel con mayor FPS, lo cual es con acuerdo con los resultados de actividad fotoprotectora.
3. Se establece a través del proceso cromatográfico la probable presencia de varios compuestos liquénicos, en especial, de atranorina y ácido salizínico presuntamente responsables de la actividad fotoprotectora de los extractos analizados.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda la aplicación en futuros estudios de fotoprotección de un método para determinar el FPS in vitro a concentraciones mayores.
- Se recomienda tomar las precauciones necesarias en el desarrollo del método propuesto para la valoración de actividad fotoprotectora ya que existen diversos puntos en los cuales puede producirse un error en el análisis el mismo que malogre un resultado.
- Es necesario realizar un estudio previo de la densidad de crecimiento bacteriana a través del tiempo tras exposición a la radiación UVB con el objeto de realizar las diluciones correctas.

GLOSARIO DE TERMINOS

CÁNCER

Enfermedad neoplásica con transformación de las células, que proliferan de manera anormal e incontrolada.

ÍNDICE DE RADIACIÓN SOLAR MUNDIAL

El índice UV solar mundial (IUV) es una medida de la intensidad de la radiación UV solar en la superficie terrestre.

MUTACIÓN

Alteración producida en la estructura o en el número de los genes o de los cromosomas de un organismo transmisible por herencia.

ERITEMA

Inflamación superficial de la piel, caracterizada por manchas rojas.

RADIACIÓN UV

Energía electromagnética emitida a longitudes de onda menores que la correspondiente a la visible por el ojo humano entre 100 y 360 nm

RADIACIÓN UVA

Radiación ultravioleta comprendida entre el rango de 315-400nm

RADIACIÓN UVB

Radiación ultravioleta comprendida entre el rango de 280-315nm

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Corresponde al número mínimo de células separables sobre la superficie o de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes.

BIBLIOGRAFÍA

AGENCIA ESPACIAL CIVIL ECUATORIANA. (2015). *exa.ec* [blog] 2015 [Consultado 01 de Octubre del 2015]. Disponible en: http://www.exa.ec/AMERICAN_CANCER_SOCIETY. (2015).

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Radiación ultravioleta* [blog] 2015 [Consultado 02 de Octubre del 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.org>

ATCC. *Who we are.* [blog] 2015 [Consultado 03 de Octubre 2015]. Disponible en: <http://www.atcc.org>

AVILA, J; CASTAÑEDA, C; BENITEZ, F; DURÁN, D; BARROSO, V; & MARTÍNEZ, C. “Photoprotective activity of *Buddleja scordiooides*”. *Fitoterapia*, vol.76, nº3 (2005) pp. 213-221.

BIOLOGICALS, D. *Mcfarlandstandard.* [blog] 2015 [Consultado 19 de Diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.dalynn.com>

CASTILLO, Y. *Factores culturales que inciden en la presencia de cáncer de piel en pacientes de SOLLA y del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social de la ciudad de Ibarra en el periodo de Enero a Julio del 2012.* (Tesis) (pregrado), Universidad Técnica del Norte, Facultad Ciencias de la Salud. Ibarra (Ecuador). 2012, pp. 40-46

COLEGIO DE FARMACEUTICOS DE BARCELONA. [blog] 2015 [Consultado 2 de Octubre 2015]. Disponible en: <http://www.farmaceuticonline.com>

CHICAIZA, M. *Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de diferentes extractos del liquen *Parmelina tiliacea**”(Tesis) (pregrado), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba (Ecuador).2015,pp.41

DALYNN BIOLOGICALS. *Dalynn.com* [blog] 2015 [Consultado 19 de Diciembre 2015]. Disponible en: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf

EL DIARIO EL COMERCIO. “El cáncer de piel aparece en Quito a edades cada vez más tempranas”. *El comercio.com*. vol 9, n° 4 (2012), (Ecuador) pp.1-3

ELIX, J. "A catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances". *anbg.gov.au [en línea]*, 2014, vol. 23, n° 5 pp.112-120. [Consulta: 21 de Diciembre 2015]. Disponible en: <https://www.anbg.gov.au/abrs/lichenlist/Chem%20Cat%203.pdf>

FAHSELT, D. “Secondary Biochemistry of lichens”. *Canadian Journal of Botany*, vol.16, n°1 (1997) pp. 23-29

FIORENZA, R., ROSAN, S., BOEHM, K., FERNANDEZ, E., & HIDALGO, E. "Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens". *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol. 68, n°13 (2002), pp.133-139.

FRANÇOISE, L., DÉVÉHAT, B., & CÉLINE, J. "Lichenic extracts and metabolites as UV filters". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 120, n°5 (2013), pp.17-28.

FREE AND OPEN ACCESS TO BIODIVERSITY DATA. *Halenia weddelliana Gilg* [blog] 2013 [Consultado 22 de Enero 2015]. Disponible en: <http://www.gbif.org/species/131727904>

FRITZ, K., RUTH, E., & SUPPIAH, W. "Lichens – Photophysical studies of potential new sunscreens". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 95 n°4 (2009), pp.40-45.

JANETA, M. *Actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro de las fracciones aisladas por cromatografía preparativa en capa fina de (Parmelina tiliacea).* (Tesis) (pregrado), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba (Ecuador).2015,pp.55-62

GARCÍA, L., & GARCÍA, S. *Asturias.es* [blog] 2015 [Consultado 08 de Diciembre 2015]. Disponible en: <https://www.asturias.es>

GEISILAINÉ, SOARES. "Preparación de un protector solar y evaluación de la acción fotoprotectora del propóleo verde del Vale do Aco, Minas Gerais, Brasil". *Redalyc*, vol. 8, n^o4 (2009), (Brasil) pp. 111-151

GONÇALVES, OLIVEIRA., ARAÚJO, SOUZA., ROCHA, SOUZA., LEITE, GUIMARÃES., OLIVEIRA, A., GOMES, SARAIVA. "In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae)". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 3, n^o1 (2013) pp. 122-127.

HANA, M., KNUT, M., & YNGVAR, G. "Annual variation in photoacclimation and photoprotection" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol.83, n^o15 (2006), pp. 151-162.

HONEGGER, R. "Ultrastructural studies in lichens". *New Phytol*, vol. 103, n^o8 (1986), pp.797-808.

JOEL, M. "Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites". *Plant Genetic Resources*, vol. 3, n^o 2 (2005), pp. 136-142.

KHANH, M., NICOLAS, G., & SOPHIE, T. "UV-protectant metabolites from lichens and their". *The Royal Society of Chemistry*, vol. 30, n^o 14 (2013), pp. 269-275.

MATA, M. *Web_herbarios* [blog] 2011 [Consultado 02 de Octubre 2015]. Disponible en: http://www.inbio.ac.cr/web_herbarios/web/pdf/protocolo-hongos.pdf

MORENO, M. "Fotoprotección". *Rev Asoc Colomb Dermatol*, vol. 18, n^o 9 (2010), pp.31-39.

MÜLLER, K. "Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 56 n^o 2 (2001), pp.9-16.

NYBAKKEN, S., & BILGER, G. (2004) The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia*, 140(2), 238-241.

OCHOA, M., & MALDONADO, C. *Características de los estilos de vida que favorecen la exposición a los rayos ultravioleta en la población residente en la ciudad de Cuenca.* (Tesis) (Pregrado). Facultad de Medicina. Universidad del Azuay. Cuenca (Ecuador). 2010, pp.40-45

ORGANIZATION WORLD HEALTH. *Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programme* [blog] 2015 [Consultado 01 de Octubre 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/uv/health/en/>

PUBCHEM. *Pubchem.ncbi.nlm.nih* [blog] 2015 [Consultado 4 de Diciembre 2015]. Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/542116#section=Top>

ROBLES, M., SARRUFA, F., NUNES, I., HAROUTIOUNIAN, C., KANEKOA, T., & ROLIM, A. "Broad spectrum bioactive sunscreens". *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 363, nº1(2008), pp.1-2.

SINMALEZA, J. *Actividad fotoprotectora in vitro de los extractos de Halenia weddeliana Gilg.* (Tesis) (pregrado), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba (Ecuador).2015,pp.55-62

SCHLUMPF, S., OLIVER, C., MICHAELA, C., MANUEL, L., KIRSTEN, S., & BARRY, J. "Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review". *International Journal of Andrology*, vol. 34, n^a 5, pp.144-151.

SHARAPIN, N. (2000). *Extracciones fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos.* 1^oed. Bogota-Colombia: Roberto Pinzon, 2000, pp.66-69.

SKIN CANCER FOUNDATION. *Skincancer.org* [blog] 2015 [Consultado 2 de Octubre 2015]. Disponible en: <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information>

SOLHAUG, K. "UV-induction of sun-screening pigments in lichens". *New Phytologist*, vol. 158, nº 91 (2002), pp.130-138.

STOJANOVIĆ, I. "Effects of Depsidones from Hypogymnia physodes on HeLa Cell Viability and Growth". *Folia Biologica*, vol. 60, nº 8 (2014), pp.89-94.

TERUEL, I. *Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de filtros uv: de los productos cosméticos al cuerpo humano y al medio ambiente.* (Tesis) (pregrado). [en línea] Universidad de Valencia, Facultad de Química, Departamento de Química Analítica. Valencia (España). 2015, pp. 38-43 [Consulta: 08 Diciembre 2015]. Disponible en: <http://mobiroderic.uv.es/bitstream/handle/10550/45170/Tesis%20Doctoral%20Isuha%20Mar%C3%ADa%20Tarazona%20Teruel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

VASUDEO, P., ZAMBARE, P. "Biopharmaceutical potential of lichens". *Pharmaceutical Biology*, vol. 50, n^o 6 (2012) pp. 23-35

VIDRIO, R. "Cáncer de piel". *Revista de la Facultad de Medicina*, vol. 46, n^o4 (2003), pp.4-8

VIOLANTE, P., SOUZA, I., VENTURINI, C., RAMALHO, A., SANTOS, R., & FERRARI, M. "Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso". *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 19, n^o2 (2009), pp.406-410.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programm* [blog] 2015 [Consultado 2 de Octubre 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/uv/en/>

YASUHIRO, H. "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin". *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 195, n^o 21(2004), pp.298-308.

ZAPATA, J. "Patentabilidad de los extractos vegetales". *Medscape* [en línea], 2002, 8(3), pp.28-35 [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc>

ANEXOS

ANEXO A: Análisis estadístico 20ppm

Descriptivos

auc

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
etanol	3	2412,0833	1,89297	1,09291	2407,3809	2416,7857	2410,75	2414,25
etilo	3	327,1667	60,19776	34,75520	177,6271	476,7062	257,75	365,00
hexano	3	53,0000	16,52271	9,53939	11,9553	94,0447	34,00	64,00
cloroformo	3	781,8333	241,58207	139,47747	181,7102	1381,9565	523,25	1001,75
omc	3	3003,6667	486,79727	281,05254	1794,3952	4212,9381	2513,00	3486,50
pamidato	3	3388,6667	123,04301	71,03892	3083,0109	3694,3225	3259,50	3504,50
Total	18	1661,0694	1374,06677	323,87064	977,7621	2344,3768	34,00	3504,50

Prueba de homogeneidad de varianzas

auc

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,922	5	12	,059

Pruebas de normalidad

extracto	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
auc						
etanol	,358	3	.	,812	3	,143
etilo	,371	3	.	,785	3	,079
hexano	,340	3	.	,848	3	,235
cloroformo	,240	3	.	,974	3	,692
omc	,178	3	.	,999	3	,954
pamidato	,206	3	.	,993	3	,838

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: auc
HSD de Tukey

(i) extracto	(j) extracto	Diferencia de medias (i-j)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
etanol	etilo	2084,91667 [*]	186,89671	,000	1457,1454	2712,6879
	hexano	2359,08333 [*]	186,89671	,000	1731,3121	2986,8546
	cloroformo	1630,25000 [*]	186,89671	,000	1002,4787	2258,0213
	omc	-591,58333 [*]	186,89671	,069	-1219,3546	-26,1879
etilo	pamidato	-976,58333 [*]	186,89671	,002	-1604,3546	-348,8121
	etanol	-2084,91667 [*]	186,89671	,000	-2712,6879	-1457,1454
	hexano	274,16667	186,89671	,689	-353,6046	901,9379
	cloroformo	-454,66667	186,89671	,219	-1082,4379	173,1046
hexano	omc	-2676,50000 [*]	186,89671	,000	-3304,2713	-2048,7287
	pamidato	-3061,50000 [*]	186,89671	,000	-3689,2713	-2433,7287
	etanol	-2359,08333 [*]	186,89671	,000	-2986,8546	-1731,3121
	etilo	-274,16667	186,89671	,689	-901,9379	353,6046
cloroformo	omc	-728,83333 [*]	186,89671	,020	-1356,6046	-101,0621
	etanol	-2950,66667 [*]	186,89671	,000	-3578,4379	-2322,8954
	etilo	-3335,66667 [*]	186,89671	,000	-3963,4379	-2707,8954
	pamidato	-1630,25000 [*]	186,89671	,000	-2258,0213	-1002,4787
omc	etanol	454,66667	186,89671	,219	-173,1046	1082,4379
	etilo	728,83333 [*]	186,89671	,020	101,0621	1356,6046
	hexano	-2221,83333 [*]	186,89671	,000	-2849,6046	-1594,0621
	pamidato	-2606,83333 [*]	186,89671	,000	-3234,6046	-1979,0621
pamidato	etanol	591,58333	186,89671	,069	-36,1879	1219,3546
	etilo	2676,50000 [*]	186,89671	,000	2048,7287	3304,2713
	hexano	2950,66667 [*]	186,89671	,000	2322,8954	3578,4379
	cloroformo	2221,83333 [*]	186,89671	,000	1594,0621	2849,6046
etanol	pamidato	-385,00000	186,89671	,367	-1012,7713	242,7713
	etilo	976,58333 [*]	186,89671	,002	348,8121	1604,3546
	hexano	3061,50000 [*]	186,89671	,000	2433,7287	3689,2713
	cloroformo	3335,66667 [*]	186,89671	,000	2707,8954	3963,4379
etilo	omc	2606,83333 [*]	186,89671	,000	1979,0621	3234,6046
	omc	385,00000	186,89671	,367	-242,7713	1012,7713

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Fuente: Javier Urbina, 2015

ANEXO B: Análisis estadístico 200ppm

Descriptivos

auc

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
etanol	3	5381,0000	514,04505	296,78405	4104,0413	6657,9587	4851,25	5877,75
etilo	3	1037,6667	216,57163	125,03769	499,6729	1575,6604	868,50	1281,75
hexano	3	1355,3333	246,60968	142,38016	742,7209	1967,9457	1085,00	1568,00
cloroformo	3	2920,0000	396,75213	229,06495	1934,4131	3905,5869	2596,00	3362,50
omc	3	4033,1667	490,52531	283,20492	2814,6342	5251,6991	3575,50	4551,00
pamidato	3	4421,0000	323,96335	187,04033	3616,2304	5225,7696	4107,50	4754,50
Total	18	3191,3611	1663,52721	392,09712	2364,1085	4018,6137	868,50	5877,75

Prueba de homogeneidad de varianzas

auc

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,574	5	12	,719

ANOVA de un factor

auc

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	45294604,40	5	9058920,881	62,122	,000
Intra-grupos	1749883,000	12	145823,583		
Total	47044487,40	17			

Pruebas post hoc

Pruebas de normalidad

auc	extracto	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	etanol	,200	3	.	,995	3	,862
	etilo	,260	3	.	,958	3	,605
	hexano	,196	3	.	,996	3	,879
	cloroformo	,285	3	.	,932	3	,496
	omc	,201	3	.	,994	3	,857
	pamidato	,192	3	.	,997	3	,894

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Variable dependiente: auc

HSD de Tukey

(i) extracto	(j) extracto	Diferencia de medias (i-j)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
etanol	etilo	4343,33333 [*]	311,79436	,000	3296,0408	5390,6259
	hexano	4025,66667 [*]	311,79436	,000	2978,3741	5072,9592
	cloroformo	2461,00000 ⁰	311,79436	,000	1413,7074	3508,2926
	omc	1347,83333 [*]	311,79436	,010	300,5408	2395,1259
	pamidato	960,00000	311,79436	,080	-87,2926	2007,2926
etilo	etanol	-4343,33333 [*]	311,79436	,000	-5390,6259	-3296,0408
	hexano	-317,66667 [*]	311,79436	,903	-1364,9592	729,6259
	cloroformo	-1882,33333 [*]	311,79436	,001	-2929,6259	-835,0408
	omc	-2995,50000 ⁰	311,79436	,000	-4042,7926	-1948,2074
	pamidato	-3383,33333 [*]	311,79436	,000	-4430,6259	-2336,0408
hexano	etanol	-4025,66667 [*]	311,79436	,000	-5072,9592	-2978,3741
	etilo	317,66667 [*]	311,79436	,903	-729,6259	1364,9592
	cloroformo	-1564,66667 [*]	311,79436	,003	-2611,9592	-517,3741
	omc	-2677,83333 [*]	311,79436	,000	-3725,1259	-1630,5408
	pamidato	-3065,66667 [*]	311,79436	,000	-4112,9592	-2018,3741
cloroformo	etanol	-2461,00000 ⁰	311,79436	,000	-3508,2926	-1413,7074
	etilo	1882,33333 [*]	311,79436	,001	835,0408	2929,6259
	hexano	1564,66667 [*]	311,79436	,003	517,3741	2611,9592
	omc	-1113,16667 [*]	311,79436	,035	-2160,4592	-65,8741
	pamidato	-1501,00000 ⁰	311,79436	,004	-2548,2926	-453,7074
omc	etanol	-1347,83333 [*]	311,79436	,010	-2395,1259	-300,5408
	etilo	2995,50000 ⁰	311,79436	,000	1948,2074	4042,7926
	hexano	2677,83333 [*]	311,79436	,000	1630,5408	3725,1259
	cloroformo	1113,16667 [*]	311,79436	,035	65,8741	2160,4592
	pamidato	-387,83333 [*]	311,79436	,808	-1435,1259	659,4592
pamidato	etanol	-960,00000	311,79436	,080	-2007,2926	87,2926
	etilo	3383,33333 [*]	311,79436	,000	2336,0408	4430,6259
	hexano	3065,66667 [*]	311,79436	,000	2018,3741	4112,9592
	cloroformo	1501,00000 ⁰	311,79436	,004	453,7074	2548,2926
	omc	387,83333 [*]	311,79436	,808	-659,4592	1435,1259

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Fuente: Javier Urbina, 2015

ANEXO C: Análisis estadístico 2000ppm

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					etanol	3		
etilo	3	4490,8333	339,54173	196,03451	3647,3649	5334,3017	4135,50	4812,00
hexano	3	6576,0000	404,97253	233,81100	5569,9925	7582,0075	6179,00	6988,50
cloroformo	3	6467,1667	231,78996	133,82399	5891,3685	7042,9648	6270,00	6722,50
omc	3	5994,0833	800,64604	462,25321	4005,1683	7982,9984	5124,25	6700,25
pamidato	3	5489,7500	204,50443	118,07069	4981,7328	5997,7672	5301,75	5707,50
Total	18	7364,4583	3699,05384	871,87535	5524,9621	9203,9545	4135,50	16380,75

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,231	5	12	,118

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	227959645,1	5	45591929,02	117,623	,000
Intra-grupos	4651342,667	12	387611,889		
Total	232610987,8	17			

Pruebas de normalidad

extracto	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
auc	,200	3	,	,995	3	,862
etanol	,260	3	,	,958	3	,605
etilo	,196	3	,	,996	3	,879
hexano	,285	3	,	,932	3	,496
cloroformo	,201	3	,	,994	3	,857
omc	,192	3	,	,997	3	,894

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Variable dependiente: auc
HSD de Tukey

i) extracto	j) extracto	Diferencia de medias (i-j)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
etanol	etiló	10678,09333 [*]	508,33840	,000	8970,6149	12385,5518
	hexano	8592,91667 [*]	508,33840	,000	6885,4482	10300,3851
	cloroformo	8701,75000 [*]	508,33840	,000	6994,2815	10409,2185
	omc	9174,83333 [*]	508,33840	,000	7467,3649	10882,3018
	pamidato	9679,16667 [*]	508,33840	,000	7971,6962	11386,6351
etiló	etanol	-10678,09333	508,33840	,000	-12385,5518	-8970,6149
	hexano	-2085,16667 [*]	508,33840	,014	-3792,6351	-377,6962
	cloroformo	-1978,33333 [*]	508,33840	,020	-3883,8018	-268,8649
	omc	-1503,25000	508,33840	,097	-3210,7185	204,2185
	pamidato	-998,91667 [*]	508,33840	,413	-2708,3851	708,5518
hexano	etanol	-8592,91667 [*]	508,33840	,000	-10300,3851	-6885,4482
	etiló	2085,16667 [*]	508,33840	,014	377,6962	3792,6351
	cloroformo	108,83333	508,33840	1,000	-1598,6351	1816,3018
	omc	581,91667	508,33840	,854	-1125,5518	2289,3851
	pamidato	1086,25000	508,33840	,332	-621,2185	2793,7185
cloroformo	etanol	-8701,75000 [*]	508,33840	,000	-10409,2185	-6994,2815
	etiló	1978,33333 [*]	508,33840	,020	268,8649	3683,8018
	hexano	-108,83333	508,33840	1,000	-1816,3018	1598,6351
	omc	473,09333	508,33840	,931	-1234,3851	2180,5518
	pamidato	977,41667	508,33840	,434	-730,0518	2684,9851
omc	etanol	-9174,83333 [*]	508,33840	,000	-10882,3018	-7467,3649
	etiló	1503,25000	508,33840	,097	-204,2185	3210,7185
	hexano	-581,91667	508,33840	,854	-2289,3851	1125,5518
	cloroformo	-473,09333	508,33840	,931	-2180,5518	1234,3851
	pamidato	504,33333	508,33840	,912	-1203,1351	2211,8018
pamidato	etanol	-9679,16667 [*]	508,33840	,000	-11386,6351	-7971,6962
	etiló	998,91667	508,33840	,413	-708,5518	2706,3851
	hexano	-1086,25000	508,33840	,332	-2793,7185	621,2185
	cloroformo	-977,41667	508,33840	,434	-2684,8851	730,0518
	omc	-504,33333	508,33840	,912	-2211,8018	1203,1351

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Fuente: Javier Urbina, 2015