



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

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Oreocallis grandiflora*.

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: DENNIS SANTIAGO CAJAMARCA GUAMÁN

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

Riobamba – Ecuador

2016

©2016, Dennis Santiago Cajamarca Guamán

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Oreocallis grandiflora*” de responsabilidad del señor Dennis Santiago Cajamarca Guamán, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc.

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Lcda. Karen Acosta, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

NOTA DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Dennis Santiago Cajamarca Guamán, 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, 01 de agosto del 2016

Dennis Santiago Cajamarca Guamán

Cédula de identidad 060406753-8

Yo, Dennis Santiago Cajamarca Guamán, 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.

DENNIS SANTIAGO CAJAMARCA GUAMÁN

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación se lo dedico a las personas más importantes de mi vida, mis padres, que con su amor, ejemplo, esfuerzo y comprensión me han sabido guiar y apoyar en todo momento siendo los pilares fundamentales para conseguir este objetivo de mi vida profesional. A mis hermanos y buenos amigos que de una u otra forma han sido parte de mis penas y glorias a lo largo de este viaje enigmático y misterioso que es la vida misma.

Dennis

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a Dios por bendecir mi vida con salud, buenos amigos y una amorosa familia; así como también por brindarme una nueva oportunidad todos los días para ser una mejor persona y la fuerza necesaria para alcanzar mis sueños y metas a base de amor, sacrificio y dedicación.

A mis queridos padres Guido Cajamarca y Martha Guamán por su inmenso amor, comprensión y apoyo durante toda mi vida. A toda mi familia en especial a mi hermana Isabel por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, ustedes son y serán mi aliento y motivación para salir adelante y superarme todos los días.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por la formación profesional que me ha brindado. Al Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, encabezado por la Dra. Susana Abdo, por permitirme ser parte de este gran proyecto. A mi tutor, BQF. Diego Vinueza Tapia y colaboradora Lcda. Karen Acosta por prestarme su apoyo, conocimientos y sobretodo su valiosa amistad durante la realización del presente trabajo de investigación.

Dennis

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American type culture collection
CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
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 colonias
μL	microlitros
UV	Ultravioleta
UVA	Radiación ultravioleta A
UVB	Radiación ultravioleta B
UVC	Radiación ultravioleta C
W/m²	Intensidad de radiación
nm	nanómetros

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vii
TABLA DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Luz solar.....	5
1.2 Radiación ultravioleta.....	6
1.3 Tipos de radiación UV.....	6
1.4 Factores que determinan la intensidad de la radiación UV.....	7
1.5 Índice ultravioleta.....	8
1.6 Efectos de la radiación UV en la salud.....	9

1.7	Radiación UV y cáncer de piel.....	10
1.8	Fototipos cutáneos.....	11
1.9	Fotoprotección.....	12
1.10	Protectores solares.....	13
1.11	Filtros solares.....	14
1.11.1	<i>Filtros físicos</i>	14
1.11.2	<i>Filtros químicos</i>	15
1.11.3	<i>Filtros biológicos</i>	16
1.12	Factor de protección solar.....	16
1.13	Flavonoides en plantas.....	18
1.13.1	<i>Flavonoides con actividad fotoprotectora</i>	19
1.14	Extracto vegetal.....	19
1.15	Cromatografía en capa fina.....	20
1.16	Liofilización.....	21
1.17	Estándar McFarland.....	22
1.18	<i>Escherichia coli</i>	22
1.19	ATCC.....	23
1.20	<i>Oreocallis grandiflora</i>	23
1.20.1	<i>Descripción botánica</i>	24
1.20.2	<i>Usos medicinales</i>	25
1.21	Antecedentes de la Investigación.....	25
 CAPÍTULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO	28
2.1	Lugar de investigación.....	28
2.2	Recolección del material vegetal.....	28
2.3	Identificación botánica y taxonómica.....	28

2.4	Acondicionamiento del material vegetal.....	28
2.5	Control de calidad de la droga cruda.....	29
2.5.1	<i>Determinación del contenido de humedad.....</i>	29
2.5.2	<i>Determinación de cenizas totales.....</i>	29
2.5.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua.....</i>	30
2.5.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....</i>	31
2.6	Tamizaje fitoquímico.....	31
2.7	Obtención del extracto seco de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	34
2.8	Cromatografía en capa fina.....	35
2.9	Preparación del estándar McFarland.....	35
2.10	Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida.....	36
2.11	Determinación del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i>	37
2.12	Determinación del contenido de flavonoides totales.....	38
2.13	Barrido espectral UV.....	38
2.14	Análisis estadístico de datos.....	39

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
3.1	Control de calidad de la droga cruda.....	40
3.1.1	<i>Determinación del contenido de humedad.....</i>	40
3.1.2	<i>Determinación de cenizas totales.....</i>	41
3.1.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua.....</i>	41
3.1.4	<i>Determinación de Cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....</i>	41
3.2	Tamizaje fitoquímico.....	42
3.3	Extracto seco de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	43
3.4	Cromatografía en capa fina.....	44
3.5	Control de calidad del estándar McFarland.....	46

3.6	Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida.....	47
3.7	Factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i>.....	53
3.8	Contenido de flavonoides totales.....	55
3.9	Barrido espectral UV.....	57
	CONCLUSIONES.....	61
	RECOMENDACIONES.....	62
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. La radiación electromagnética según la longitud de onda.....	5
Tabla 2-1. Categorías de índice UV.....	8
Tabla 3-1. Efectos nocivos en la salud por sobreexposición a radiación UV.....	10
Tabla 4-1. Fototipos cutáneos.....	12
Tabla 5-1. Categorías de FPS según COLIPA.....	17
Tabla 6-1. Categorías de FPS según FDA.....	17
Tabla 1-2. Preparación del estándar McFarland.....	36
Tabla 2-2. Valores de EE x I preestablecidos.....	37
Tabla 3-2. Bandas de absorción UV para flavonoides.....	39
Tabla 1-3. Resultados del control de calidad de la droga cruda.....	40
Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	43
Tabla 3-3. Posibles compuestos identificados en hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i> por TLC.....	45
Tabla 4-3. Absorbancia de los estándares McFarland.....	46
Tabla 5-3. Efecto fotoprotector del extracto etanólico de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	47
Tabla 6-3. Efecto fotoprotector del control positivo pamidato-o.....	48
Tabla 7-3. Efecto fotoprotector del control positivo octilmetoxicinamato (OMC).....	49
Tabla 8-3. Porcentaje de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> frente a radiación UVB.....	50
Tabla 9-3. Resultados del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i>	54
Tabla 10-3. Contenido de flavonoides totales en hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	56
Tabla 11-3. Posibles compuestos responsables del efecto fotoprotector por barrido UV.....	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-2. Preparación de extractos para realizar el tamizaje fitoquímico.....	32
Gráfico 2-2. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.....	33
Gráfico 3-2. Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.....	33
Gráfico 4-2. Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.....	34
Gráfico 1-3. Curva de calibración del estándar McFarland.....	46
Gráfico 2-3. Efecto fotoprotector del extracto etanólico de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	48
Gráfico 3-3. Efecto fotoprotector del control positivo pamidato-o.....	49
Gráfico 4-3. Efecto fotoprotector del control positivo octilmetoxicinamato (OMC).....	50
Gráfico 5-3. Porcentaje de supervivencia de <i>Escherichia coli</i> frente a radiación UVB.....	51
Gráfico 6-3. UFC sobrevivientes vs tiempo de exposición a radiación UVB.....	53
Gráfico 7-3. Comparación de resultados del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i>	54
Gráfico 8-3. Espectros de absorción de los extractos de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	58
Gráfico 9-3. Espectros de absorción de los controles positivos.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Radiación UV y la piel.....	7
Figura 2-1. Estructura básica de los flavonoides.....	18
Figura 3-1. <i>Oreocallis grandiflora</i>	23
Figura 1-3. TLC del extracto etanólico de hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>	44

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Guía de movilización y entrega de muestras vegetales al Herbario de la Espoch.....	72
ANEXO B: Autorización de Investigación Científica.....	73
ANEXO C: Análisis estadístico del efecto de protección solar.....	74
ANEXO D: Curva de calibración del estándar de quercetina	78
ANEXO E: Evidencia fotográfica del trabajo de investigación.....	79

RESUMEN

El objetivo fue determinar la actividad fotoprotectora *in vitro* de los subextractos etanólicos de hojas de cucharilla (*Oreocallis grandiflora*) a 2000, 200 y 20 ppm. Se realizó la recolección del material vegetal, su acondicionamiento y control de calidad de la droga cruda. Mediante el tamizaje fitoquímico de los extractos preparados con solventes de polaridad creciente se identificó de manera cualitativa la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides dentro de su composición química. El extracto seco utilizado en todos los ensayos se obtuvo por liofilización del extracto acuoso congelado libre de clorofilas, grasas y etanol. La cromatografía en capa fina (TLC) reveló la posible presencia de flavonoides glicosidos. El factor de protección solar (FPS) *in vitro* y el contenido de flavonoides totales fueron determinados mediante técnicas espectrofotométricas utilizando la ecuación de Mansur y cloruro de aluminio respectivamente. La actividad fotoprotectora se comprobó mediante el método de muerte celular inducida por exposición de bacterias *Escherichia coli* (ATCC 25922) a radiación ultravioleta (UVB), el número de unidades formadoras de colonias (UFC) sobrevivientes fue detectado en intervalos de 30 minutos durante 3 horas. El contenido de flavonoides totales fue de 53.57g equivalentes de quercetina por cada 100g de extracto seco. Con un valor de 13.56 el FPS del subextracto etanólico es superior que los controles positivos a la misma concentración de 10 ppm cuyos FPS fueron 6.21 y 11.82 para el pamidato-o y octilmetoxicinamato respectivamente. El subextracto etanólico a 2000 ppm con mayor porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* mostró mejor efecto fotoprotector que el resto de subextractos y controles positivos de menor concentración. Se concluyó que el FPS y el efecto fotoprotector aumentan de manera proporcional a la concentración del subextracto. Se recomienda elucidar estructuralmente los compuestos responsables de la actividad fotoprotectora para ser utilizados como nuevos filtros UVB.

PALABRAS CLAVE: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS MÉDICAS>, <BIOQUÍMICA>, <CUCHARILLA (*Oreocallis grandiflora*)>, <SUBEXTRACTO>, <FLAVONOIDES>, <ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA>, <FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)>, <RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UVB)>.

SUMMARY

The goal of this research is to determine photoprotective *in vitro* activity of sub-extract ethanol “cucharilla” leaves (*Oreocallis grandiflora*) to 2000, 200, 20 ppm. We collected all vegetal material, its conditioning and quality control of the raw drug. By using a phytochemical filter of the extracts prepared with solvents of increasing polarity, we could identify qualitatively the presence of phenolic and flavonoid compounds in its chemical composition. We obtained the dry extract that we used in all tests by freeze-drying of freeze liquid extract with no chlorophyll, grass and ethanol. A thin layer chromatography (TLC) showed a possible presence of glycosides flavonoid. The sun protection factor (SPF) *in vitro*, and the total flavonoid content were determined by spectrophotometric techniques by using Mansur equation and aluminium chloride. We tested the photoprotector activity by using the method of induced cell death which by exposing *Escherichia coli* bacteria (ATCC 25922) to ultraviolet radiation (UVB), the quantity of surviving colony forming units (UFC) were detected in intervals of 30 minutes, during 3 hours. The content of total flavonoid were 53.57 g. equivalent of quercetin per each 100 g. of dry extract. With a value of 13.56 the FPS were 6.21 and 11.82 for the padimate-o and octylmethoxycinnamate. The ethanol sub-extract to 2000 ppm with a high percent of surviving of *Escherichia coli* showed a better photoprotector effect than the rest of sub-extracts and positive controls of less concentration. We conclude that FPS and the photoprotector effect increases proportionally to the sub-extract concentration. We strongly recommend make clear structurally the responsible compounds of the photoprotector activity to be used as new filters UVB.

KEYWORDS: <TECHNOLOGY AND MEDICAL SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY>, <CUCHARILLA (*Oreocallis grandiflora*)>, <SUB-EXTRACT>, <FLAVONOID>, <PHOTOPROTECTOR ACTIVITY>, <SUN PROTECTION FACTOR (SPF)>, <ULTRAVIOLET RADIATION (UVB)>

INTRODUCCIÓN

La contaminación irresponsable e indiscriminada del medio ambiente provoca la degradación acelerada de la capa de ozono, como consecuencia de esto los rayos solares alcanzan con facilidad la superficie terrestre atravesando de forma más directa dicha capa que se encuentra en constante deterioro principalmente en la zona geográfica ecuatorial. El Ecuador se ve afectado por este tipo de radiación con mayor intensidad ya que los rayos solares inciden más directamente debido a varios factores como son principalmente su altitud, latitud y posición geográfica. (López, 2011a, p.311)

La exposición directa y prolongada a radiación solar constituye una grave amenaza para la salud e integridad de las personas de todo el mundo llegando a provocar enfermedades degenerativas de la piel e incluso cáncer, resultado del estrés oxidativo provocado por la generación excesiva de radicales libres que alteran el material genético de las células afectadas. (González, 2003a, p.70)

La luz UVB es la responsable de la mayor parte de los daños biológicos de la piel ocasionados por la luz solar siendo considerada de 1000 a 100 000 veces más cancerígena que la UVA. Por lo tanto, es importante evitar los daños causados en el ADN por este tipo de radiación. (Schmidt, 2013, p.99)

La radiación UVB (290 – 320 nm) que es absorbida a nivel de la epidermis comprende apenas el 5% de la radiación UV que recibimos; mientras que la UVA (320 – 400 nm) que logra penetrar la epidermis hasta llegar a la dermis representa el 95% restante. La radiación UVC es absorbida por la capa de ozono, por lo que no alcanza la superficie terrestre (otras radiaciones de longitudes de onda inferiores a 280 nm tampoco llegan a nuestro planeta). (López, 2011b, p.312)

En los seres humanos, la exposición a radiación UVB puede provocar efectos graves y crónicos en la piel, ojos y sistema inmune. El eritema de la piel es el efecto que se observa con mayor frecuencia debido a la exposición desprotegida y prolongada a este tipo de radiación; la misma que también puede inducir cambios degenerativos en las células de la piel, tejido fibroso y vasos sanguíneos conllevando así a varios problemas de salud como el envejecimiento prematuro de la piel, inmunosupresión, fotodermatitis, queratosis actínica así como también una reacción inflamatoria a nivel de los ojos. (González, 2003b, p.72)

El índice UV solar máximo de exposición para el ser humano, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es de 11 IUV. La Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA) mediante su informe Hiperión indicó que en la ciudad de Guayaquil y Quito, al mediodía, este índice promedia los 14 y 24 IUV respectivamente, tales valores son alarmantes debido a que existe un mayor riesgo de sufrir lesiones cutáneas y oculares. (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008a).

A nivel mundial mueren millones de personas producto del cáncer de piel, la población más afectada por este tipo de radiación son aquellas personas de test blanca y albina, ya que sus fototipos de piel carecen del pigmento conocido como melanina, por tal motivo pueden sufrir daños muy graves en la piel que pueden poner en riesgo sus vidas. (Skin Cancer Foundation, 2016a)

La Organización Mundial de la Salud estima que cada año se producen en todo el mundo entre dos y tres millones de casos de cáncer de piel no melanocítico y aproximadamente 132 000 casos de cáncer de piel melanocítico; estas cifras están destinadas a aumentar en los próximos años debido a la exposición crónica y prematura de niños y adolescentes, siendo estos los grupos más vulnerables a los efectos dañinos provocados por este tipo de radiación. (OMS, 2003a)

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 cada 100 000 habitantes; el cáncer de piel no melanoma es uno de los principales tipos de cáncer que afecta con mayor frecuencia a la población de nuestro país especialmente en la región sierra por los factores geográficos mencionados anteriormente. En la actualidad este tipo de cáncer se encuentra en los primeros lugares entre las causas de fallecimiento por cáncer manifestado en sus principales formas como carcinoma de células basales (CBC) y carcinoma de células escamosas (CEC). (Ministerio de Salud Pública, 2013.)

Debido a las afecciones que pueden producirse a nivel dérmico resultado de la exposición prolongada y directa a radiación solar es necesario tomar medidas de protección, como el uso protectores solares que contienen sustancias químicas capaces de prevenir y contrarrestar los efectos adversos de la energía solar y, en particular, la radiación UVB.

Los filtros solares orgánicos de uso convencional pueden causar una serie de reacciones adversas en la piel, la más frecuente es la dermatitis irritativa, una intolerancia cutánea provocada por los principios activos o excipientes presentes sobre todo en protectores solares con un alto FPS. (Gilaberte et al., 2003a, pp.272-274)

Así como la radiación UV afecta a las personas también puede dañar los componentes celulares de las especies vegetales, razón por la cual ciertas plantas han logrado desarrollar mecanismos de defensa para absorber, neutralizar y disipar dicha radiación, mediante la síntesis de metabolitos secundarios. (Carrasco, 2009a, pp.65-66)

Estudios recientes han demostrado que metabolitos de naturaleza fenólica como los flavonoides, ácidos fenólicos, catequinas, proantocianidinas y estilbenos poseen propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, anticarcinogénicas, antioxidantes y fotoprotectoras; todo esto gracias a su estructura policromófora que permite absorber la radiación UV y estabilizar los radicales libres por deslocalización de los mismos en la molécula. (Martínez et al., 2002a, p.272). Estos compuestos naturales han tomado gran importancia en estudios de fotoprotección porque

previenen el envejecimiento prematuro y la interacción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) con el ADN de la piel. Así como también por su presumible seguridad, sostenibilidad y bajo impacto ambiental. (Agati et al., 2013, p.3)

Mediante la presente investigación se pretende determinar la actividad fotoprotectora de dichos compuestos naturales presentes en los extractos de las hojas de *Oreocallis grandiflora* de una manera experimental *in vitro* por el método de muerte celular inducida en bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizando un simulador de luz solar como es la lámpara UV-B, según el método propuesto por (Avila Acevedo et al., 2005a, p.303).

Dicha investigación se complementa con el control de calidad de la droga cruda, la identificación de metabolitos secundarios por tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC), evaluación del Factor de Protección Solar (FPS) *in vitro* por método espectrofotométrico mediante la ecuación de Mansur (Gonçalves et al., 2013a, p.124) y finalmente el cálculo del contenido de flavonoides totales a partir de la curva de calibración del estándar de quercetina. (Wu y Ng, 2008a, p.325)

Esta especie vegetal fue escogida como objeto de estudio debido a que posee una gran cantidad de flavonoides en su composición química, razón por la cual se desea obtener la evidencia necesaria para que sea considerada como una fuente potencial de filtros solares naturales, los mismos que pueden ser incorporados en productos cosmecéuticos que protejan la piel de la radiación UVB de manera efectiva y segura. Sin lugar a duda que este estudio contribuye con el objetivo número 3 del Plan Nacional del Buen Vivir, que es mejorar la calidad de vida de la población al tratar de solucionar un problema de salud que está en constante incremento.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad fotoprotectora *in vitro* de los extractos de hojas de *Oreocallis grandiflora*.

Objetivos Específicos

1. Comprobar el efecto fotoprotector de los extractos a través del método de muerte celular inducida en cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 por exposición a radiación UVB.
2. Reconocer los posibles compuestos responsables de la actividad fotoprotectora mediante tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina de los extractos.
3. Determinar el Factor de Protección Solar *in vitro* de los extractos por espectrofotometría mediante la ecuación de Mansur
4. Calcular el contenido de flavonoides totales de los extractos a partir de la curva de calibración de la quercetina mediante método espectrofotométrico con cloruro de aluminio.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Luz solar

La luz solar es energía radiante electromagnética compuesta principalmente por el espectro de luz ultravioleta (100 a 400 nm), luz visible (400 a 760 nm) e infrarroja (760 a 1.800 nm), aunque también están presentes longitudes de onda corta (ionizantes), y onda larga (microondas y radiofrecuencia). Estas radiaciones son modificadas de manera importante por su paso a través de la atmósfera y solamente dos tercios de esta energía penetra en la Tierra. Mediante esta manifestación de la energía se pueden llevar a cabo los procesos metabólicos en los seres vivos de manera directa o indirecta. (Cabrera y López, 2006a, pp.26-27)

Tabla 1-1. La radiación electromagnética según la longitud de onda

Banda de onda	Rango de longitud de onda (nm)
Rayos x	0.1 – 10
Ultravioleta en el vacío	10 – 200
Ultravioleta C (UV-C)	200 – 290
Ultravioleta B (UV-B)	290 – 320
Ultravioleta A (UV-A)	320 – 400
UV-A I	340 – 400
UV-A II	320 – 340
Visible	400 – 760
Infrarrojo cercano	760 – 1000
Infrarrojo lejano	1000 – 100 000
Microondas y ondas de Radio	> 10 ⁶

FUENTE: Cabrera y López, 2006

1.2 Radiación ultravioleta

La radiación solar ultravioleta o radiación UV es una parte de la energía radiante del sol, se transmite en forma de ondas electromagnéticas en cantidad casi constante, su longitud de onda fluctúa entre 100 y 400 nm y constituye la porción más energética del espectro electromagnético que incide sobre la superficie terrestre. Esta radiación desempeña un papel importante en la determinación de las condiciones climáticas, el balance energético y el equilibrio natural del planeta. Pequeñas cantidades de UV son necesarias en los seres humanos para asimilar la vitamina D; en las plantas bajo condiciones normales ayudan en el proceso de fotosíntesis pero cuando la exposición a este tipo de radiación es exagerada, los sistemas biológicos pueden verse afectados. (Bohórquez y Pérez, 2009a, pp.98-100)

Cuando la luz UV alcanza la piel, parte es reflejada, parte es absorbida, y parte es transmitida a diferentes capas de células, hasta que la energía del rayo incidente se disipa. La porción de luz que es absorbida por las moléculas en los tejidos puede causar respuestas tisulares. El daño provocado por la radiación UV dependerá de la intensidad de la radiación, el tiempo de la exposición y las características (tipo) de la piel de cada persona. (Cabrera y López, 2006b, p.27)

Aproximadamente 95% de los rayos ultravioleta recibidos en la Tierra son UVA y sólo el 5% UVB. Los rayos ultravioleta UVC son bloqueados por la capa de ozono atmosférico y no alcanzan la superficie de la tierra. Sin embargo la UVB es más responsable que la UVA en producir daño biológico, ya que contribuye con cerca del 80% de los efectos dañinos que se asocian a la exposición solar, la UVA sólo produce el 20% restante. (González et al., 2009a, p.71)

Los niveles de penetración de los rayos UVB y UVA a nivel de la piel son diferentes. El 70% de la radiación UVB es absorbida por el estrato córneo de la epidermis, a diferencia de la radiación UVA que es absorbida entre el 70-80% por células de la dermis y melanocitos de la epidermis basal. (Bohórquez y Pérez, 2009b, p.101)

1.3 Tipos de radiación UV

Se divide en tres tipos en función de su longitud de onda. Cuanto mayor sea ésta, menos energía tendrá, y viceversa.

- Rayos UVA: (longitud de onda entre 320 – 400 nm) 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.

- Rayos UVB: (longitud de onda entre 290 – 320 nm) 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.
- Rayos UVC: (longitud de onda entre 100 – 290 nm) tienen más energía que otros tipos de rayos UV, pero no penetran nuestra atmósfera y no están en la luz solar. No son normalmente una causa de cáncer de piel. (American Cancer Society, 2015)

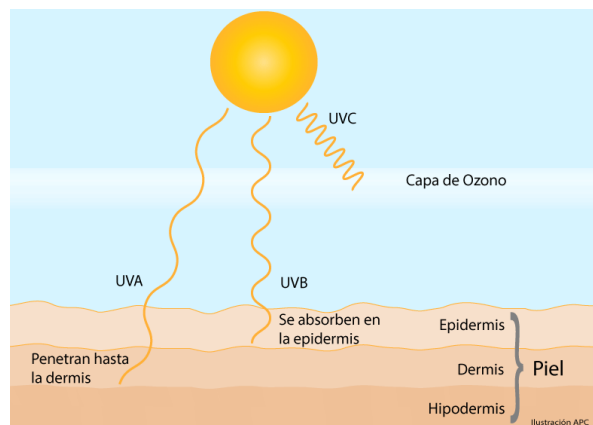


Figura 1-1. Radiación UV y la piel

FUENTE: American Cancer Society, 2015

1.4 Factores que determinan la intensidad de la radiación UV

- Hora del día: los rayos UV son más potentes entre 10 a.m. y 4 p.m.
- Temporada del año: los rayos UV son más potentes durante los meses de la primavera y el verano. Este es un factor menos importante cerca del ecuador.
- Distancia desde el ecuador (latitud): la exposición a UV disminuye a medida que se aleja de la línea ecuatorial
- Altitud: más rayos UV llegan al suelo en elevaciones más altas. Con cada 1000 metros de incremento de la altitud, la intensidad de la radiación UV aumenta en un 10 a 12%.
- Formación nubosa: el efecto de las nubes puede variar, ya que a veces la formación nubosa bloquea a algunos rayos UV del sol y reduce la exposición a rayos UV, mientras que algunos tipos de nubes pueden reflejar los rayos UV y pueden aumentar la exposición a los rayos UV. Lo que es importante saber es que los rayos UV pueden atravesar las nubes, incluso en un día nublado.
- Reflejo de las superficies: los rayos UV pueden rebotar en superficies como el agua, la arena, la nieve, el pavimento, o la hierba, lo que lleva a un aumento en la exposición a los rayos UV. (Puentes et al., 2002, p.18)

1.5 Índice ultravioleta

El índice UV solar mundial (IUV) es una medida de la intensidad de la radiación UV solar en la superficie terrestre. El índice se expresa como un valor superior a cero, y cuanto más alto, mayor es la probabilidad de lesiones cutáneas y oculares y menos tardan en producirse esas lesiones. (OMS, 2003b)

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. (Nash, 2006, p.36)

El índice tiene un valor mínimo teórico de 0 y no tiene un valor máximo. Este índice estándar permite emitir predicciones de IUV comparables en todo el mundo. Los colores utilizados son el verde para IUV bajo (entre 0 y 2), el amarillo para IUV moderado (entre 3 y 5), el naranja con un riesgo alto (entre 6 y 7), el rojo para IUV muy alto (entre 8 y 10) y el morado para IUV extremo (superior a 11). (OMS, 2013c)

El IUV es una herramienta importante para la concientización de la población sobre los riesgos de la exposición excesiva a la radiación UV y para advertir a las personas de la necesidad de adoptar medidas de protección. Este índice es útil para saber cuánto tiempo se puede estar al sol según el fototipo de piel, la edad y el protector solar que se emplee. (González et al., 2009b, p.73)

Por su posición geográfica el Ecuador recibe una gran intensidad de radiación solar ultravioleta durante prácticamente todo el año. En muchos países próximos al Ecuador, el índice UV puede llegar a un valor de 20 en verano. (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008b).

Tabla 2-1. Categorías de índice UV

CATEGORÍA DE EXPOSICIÓN	INTERVALO DE VALORES DEL IUV
BAJA	< 2
MODERADA	3 A 5
ALTA	6 A 7
MUY ALTA	8 A 10
EXTREMADAMENTE ALTA	11+

FUENTE: OMS, 2003

1.6 Efectos de la radiación UV en la salud

La radiación UV tiene efectos positivos sobre el ser humano, ya que favorece la síntesis de vitamina D, pero puede ser enormemente perjudicial cuando se sobrepasan unos límites de seguridad. La exposición excesiva a la radiación UV solar puede dar lugar a efectos tanto agudos como crónicos, especialmente para la piel y los ojos, que son los órganos más expuestos. Los efectos agudos incluyen desde eritema (enrojecimiento) y quemaduras en la piel hasta fotoqueratitis (inflamación de la córnea y el iris) y fotoconjuntivitis (inflamación de la conjuntiva). Los efectos crónicos incluyen el cáncer de piel y su fotoenvejecimiento (envejecimiento prematuro), y en el caso de los ojos, las cataratas (opacidad del cristalino) y el cáncer de conjuntiva. (Reyes y Vitale, 2013a, p.236)

El sistema inmunológico también puede resultar afectado por la sobreexposición, a través de una disminución de su funcionamiento general y de las defensas naturales de la piel, por lo que aumentan la sensibilidad de ésta al sol, el riesgo de infecciones y las reacciones alérgicas a ciertos medicamentos, a la vez que se reduce la efectividad de las vacunas. (Ferreira et al., 2012, p.136)

Los efectos de la radiación UV solar dependen de su longitud de onda. La radiación UVB o “radiación de quemaduras” produce principalmente eritemas y varios tipos de cáncer de piel (carcinoma de células basales y escamosas); También estimula las mitosis de los queratinocitos que produce engrosamiento del estrato córneo que puede triplicarse a las 72 horas de exposición solar. (Reyes y Vitale, 2013b, p.239)

La radiación UVA o “radiación de envejecimiento” tiene un efecto pronunciado en la capa subcutánea y puede alterar la estructura de las fibras de colágeno y elastina, acelerando así el envejecimiento de la piel. Tiene la capacidad de penetrar profundamente en la epidermis y en la dermis de la piel desencadenando varios procesos oxidativos donde se generen especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden causar daño a proteínas celulares, lípidos, y carbohidratos. Dado que este tipo de radiación puede producir daño estructural al DNA y dañar el sistema inmunológico, puede llevar a la formación de cáncer. La misma se ha relacionado con el 67% de los melanomas malignos. (Carrascosa y Rodríguez, 2008a, pp.448-450)

Tabla 3-1. Efectos nocivos en la salud por sobreexposición a radiación UV

	Efectos agudos	Efectos crónicos
Piel	Eritema (enrojecimiento)	Cáncer de piel
	Quemaduras	Fotoenvejecimiento
Ojos	Fotoqueratitis	Cataratas
	Fotoconjuntivitis	Cáncer de conjuntiva
Sistema inmunitario	Disminución general de la respuesta inmunitaria	
	Mayor riesgo de infecciones y reacciones alergias	
	Reducción de la efectividad de medicamentos y vacunas	

FUENTE: Ferreira, 2012

1.7 Radiación UV y cáncer de piel

Como consecuencia de una exposición repetida y prolongada a la radiación UV ocurren modificaciones en el ADN que son reparadas de forma natural por mecanismos celulares. El efecto acumulativo de modificaciones no reparadas en el ADN puede desencadenar la aparición de mutaciones puntuales en genes diana como el gen supresor de tumores p53, el cual no está únicamente alterado en cánceres de piel sino en tumores de diferente histología. Por lo tanto, el gen p53 constituye una diana clave para el inicio del proceso neoplásico de piel. (Cabrera y López, 2006c, p.30)

Existen tres tipos principales de cáncer de piel:

- Cáncer de piel de células basales (carcinoma de células basales)
- Cáncer de piel de células escamosas (carcinoma de células escamosas)
- Melanomas

A la radiación UVA por producir daño estructural del ADN y dañar el sistema inmunológico se la ha relacionado con el 67% de los melanomas malignos. Mientras que la radiación UVB es considerada como responsable de inducir cáncer en la piel de tipo escamoso y carcinoma de células basales. (Carrascosa y Rodríguez, 2008b, p.452)

Los tumores de piel representan el tipo más frecuente de neoplasias humanas. Prácticamente el 99% de ellos corresponden a tumores de piel no melanoma, carcinoma basocelular (CBC) y carcinoma espinocelular (CEC); el melanoma maligno representa un porcentaje muy pequeño, que sin embargo dada su agresividad es el responsable de la mayoría de los fallecimientos ocasionados por cáncer de piel. (Reyes y Vitale, 2013c, p.235)

El carcinoma basocelular representa la forma más frecuente de cáncer de piel, seguido por el espinocelular. Aunque son las formas más comunes de cáncer de piel, constituyen menos del 0.1% de las muertes producidas por cáncer. Ambos tumores son de origen epitelial, el carcinoma basocelular se origina a partir de las células epidérmicas pluripotenciales de la capa basal y menos frecuentemente de los anexos cutáneos; mientras que el carcinoma espinocelular se origina a partir de los queratinocitos o sus anexos epidérmicos. (De Gruijl, 2002a, p.317)

La epidemiología es similar para ambos casos en cuanto a la edad de presentación, tipo de piel y exposición solar crónica. El carcinoma basocelular es un tumor de lento crecimiento y las metástasis son excepcionales, existe una especial predisposición a desarrollarse en algunos síndromes genéticos y también en pacientes inmunodeprimidos. Estos cánceres se desarrollan generalmente en áreas expuestas al sol, especialmente en la cabeza, cuello y brazos. (Wong et al., 2003, p.795)

El melanoma maligno, en cambio, se origina a partir de los melanocitos diseminados en las capas basales de la epidermis. Los melanomas malignos se diseminan inicialmente desde los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos regionales y posteriormente por vía sanguínea, por lo que el control a tiempo de la enfermedad es extremadamente difícil. La incidencia de este tipo de cáncer está aumentando de forma dramática entre las personas de piel blanca en todo el mundo. (Houghton y Polsky, 2002, p.275)

Datos epidemiológicos y moleculares han comprobado la existencia de una estrecha relación entre el desarrollo de tumores de piel no melanoma y una excesiva exposición a la radiación UV de la luz solar. Sin embargo esta relación tan directa no está totalmente clara con respecto al origen del melanoma, en el cual parecen intervenir múltiples factores tales como: predisposición genética, exposición a luz UV (sol, fuentes artificiales) y exposición ambiental a mutágenos (sustancias químicas, virus, radiaciones), entre otros. (De Gruijl, 2002b, p.319)

1.8 Fototipos cutáneos

El fototipo es la capacidad de adaptación al sol que tiene cada persona desde que nace, es decir, el conjunto de características que determinan si una piel se broncea o no, y cómo y en qué grado lo hace. Cuanto más baja sea esta capacidad, menos se contrarrestarán los efectos nocivos de las radiaciones solares en la piel. (DeBuys et al., 2000a, p.580)

Existen diferentes tipos de piel en los que varía enormemente la capacidad de producir o activar melanina preexistente, generando respuestas diferentes ante la exposición solar. En función a esta capacidad de respuesta, Fitzpatrick clasificó a los diferentes tipos de piel en los denominados

fototipos cutáneos. Se establecen 6 fototipos diferentes que van desde el I (siempre se queman, nunca se broncea), hasta el VI (nunca se queman, siempre se broncean). Cuanto mayor es este valor numérico, más cantidad de melanina genera la piel. (DeBuys et al., 2000b, p.578)

Las personas con piel de tipo I y II están expuestas a un mayor riesgo de presentar lesiones de fotoenvejecimiento, incluyendo las arrugas y cáncer de piel; mientras que los tipos V y VI se encuentran entre los de riesgo más bajo. Esto se debe a que los que tienen más pigmentación tienen más protección natural al sol. Sin embargo, las personas con piel más oscura pueden desarrollar cáncer de piel al igual que las personas de piel clara. (Skin Cancer Foundation, 2016b)

Conocer el fototipo cutáneo y sus características resulta imprescindible a la hora de elegir la correcta protección solar para prevenir posibles trastornos de la piel por exposición a radiación solar UV.

Tabla 4-1. Fototipos cutáneos

	Acción del sol sobre la piel (no protegida)	Características pigmentarias
Fototipo I	Presenta intensas quemaduras solares, casi no se pigmenta nunca y se descama de forma ostensible	Individuos de piel muy clara, ojos azules, pelirrojos y con pecas en la piel. Su piel, habitualmente, no está expuesta al sol y es de color blanco-lechoso
Fototipo II	Se quema fácil e intensamente, pigmenta ligeramente y descama de forma notoria	Individuos de piel clara, pelo rubio, ojos azules y pecas, cuya piel, que no está expuesta habitualmente al sol, es blanca
Fototipo III	Se quema moderadamente y se pigmenta correctamente	Razas caucásicas (europeas) de piel blanca que no está expuesta habitualmente al sol
Fototipo IV	Se quema moderada o mínimamente y pigmenta con bastante facilidad y de forma inmediata al exponerse al sol	Individuos de piel morena o ligeramente amarronada, con pelo y ojos oscuros (mediterráneos, mongólicos, orientales)
Fototipo V	Raramente se quema, pigmenta con facilidad e intensidad (siempre presenta reacción de pigmentación inmediata)	Individuos de piel amarronada (amerindios, indostánicos, árabes e hispanos)
Fototipo VI	No se quema nunca y pigmenta intensamente (siempre presentan reacción de pigmentación inmediata)	Razas negras

FUENTE: Skin Cancer Foundation, 2016

1.9 Fotoprotección

La fotoprotección tiene como objetivo prevenir el daño que ocurre en nuestra piel como resultado de su exposición a la radiación UV. Por tanto, las estrategias de fotoprotección se centran en la reducción del tiempo global de exposición al sol, especialmente en horas del mediodía (12:00 a 16:00 h), llevar ropas adecuadas, utilizar gorros, gafas y aplicar fotoprotectores de amplio espectro (UVA y UVB) con factor de protección solar (FPS) 15 o superior. (Gilaberte et al., 2003b, p.276)

Para protegerse de la agresión por parte de las radiaciones solares, la piel posee unos mecanismos de adaptación y de defensa, de los cuales los más importantes son la producción de melanina, el engrosamiento de la capa córnea, los sistemas de reparación del ADN y la activación de moléculas antioxidantes,. Estos mecanismos de fotoprotección natural tienen una eficacia variable según los individuos, siendo insuficientes especialmente en las personas de fototipo claro. (Jansen et al., 2013, p.853)

La prevención de los efectos nocivos del sol en nuestra piel es aconsejable a todas las edades, siendo en la población infantil y en los adolescentes en quienes se debe hacer especial énfasis. Los niños se consideran más susceptibles a los efectos nocivos de las radiaciones UV que los adultos. Los episodios de quemaduras durante la infancia y la adolescencia han sido propuestos como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de melanoma en la vida adulta. (Valdivielso y Herranz, 2010, p.282)

La fotoprotección y la fotoexposición requieren un equilibrio para evitar los efectos nocivos del sol permitiendo todos aquellos efectos beneficiosos que el sol nos proporciona a los seres humanos en especial la síntesis de vitamina D. En la actualidad la fotoprotección se puede realizar de forma natural, externa e interna o sistémica.(Gilaberte et al., 2003c, p.278)

1.10 Protectores solares

Son sustancias que en su composición incluyen filtros solares y excipientes, por lo general de aplicación tópica, con capacidad de absorber, reflejar o dispersar la radiación UV, evitando la penetración cutánea e impidiendo así los daños ocasionados en la piel por dicha radiación solar. (Wolf et al., 2001a, p.452)

Inicialmente, el protector solar se usó para contrarrestar los efectos agudos de la radiación UV como las quemaduras solares. En la actualidad, se busca disminuir los efectos crónicos, para prevenir la aparición de carcinomas de piel, evitar el fotoenvejecimiento cutáneo, disminuir la formación de dímeros de pirimidinas, y además, proteger de la inmunosupresión cutánea desencadenada por la depleción de células de Langerhans. (Moreno y Moreno, 2010a, pp.33-34)

Los fotoprotectores más utilizados son los preparados tópicos, aunque también existen sustancias con capacidad fotoprotectora que se administran por vía oral. Los fotoprotectores del mercado normalmente están formados por una combinación de filtros orgánicos (químicos), físicos (inorgánicos) y biológicos, en menor o mayor grado, para conseguir un FPS más o menos elevado. (Wolf et al., 2001b, p.454)

Un fotoprotector de calidad es aquel que responde ante un amplio espectro de radiación (UVA y UVB) y puede prevenir e incluso reparar los daños cutáneos inducidos por la radiación solar. Sus efectos protectores incluyen los siguientes mecanismos:

- 1) absorción directa de fotones;
- 2) inhibición de la inflamación crónica;
- 3) modulación de la inmunosupresión;
- 4) inducción de apoptosis;
- 5) actividad antioxidante directa para neutralizar especies reactivas de oxígeno (ERO's)
- 6) actividad antioxidante indirecta para inducir respuestas citoprotectoras intrínsecas que permiten la detoxificación de diversos oxidantes. (Dinkova, 2008, p.1552)

Los fotoprotectores tienen que ser seguros, no solo para los seres humanos que se los aplican sobre todo el tegumento expuesto al sol, sino también para el medio ambiente, que indirectamente los recibe durante su eliminación. (Diffey, 2001, p.105)

1.11 Filtros solares

Los fotoprotectores contienen sustancias físicas, químicas y biológicas con diferentes mecanismos de acción denominados filtros solares, estos son capaces de absorber o reflejar las radiaciones solares, protegiendo a la piel de los efectos dañinos de las mismas. Los fotoprotectores actúan frente a las radiaciones UVA, UVB e infrarrojo (IR), pero presentan diferente eficacia protectora frente a ellas. Los filtros solares tienen que ser seguros y compatibles con la superficie cutánea. (Duro et al., 2003, p.40)

1.11.1 Filtros físicos

Los filtros físicos o inorgánicos, son moléculas estables a la luz que protegen a la piel de la radiación ultravioleta por dispersión, reflejo o absorción de la misma, dependiendo del tamaño de la partícula. Las sustancias aprobadas y habitualmente empleadas son el óxido de zinc (ZnO) y el dióxido de titanio (TiO₂); el primero confiere una mayor protección frente a la radiación UVA, mientras que el segundo protege mejor de la radiación UVB. Su espectro de acción es amplio, de manera que proporcionan protección frente a los rayos UVA, UVB, luz visible e infrarrojos. Actúan como sustancias pantalla inmediatamente después de aplicarlos en la piel. (Moreno y Moreno, 2010b, p.36)

Debido a que se trata de polvos inertes, no son ni irritantes ni sensibilizantes; es decir son inocuos para la salud; pero otorgan a la piel un aspecto blanquecino que los hace poco estéticos. Para mejorar este aspecto puede disminuirse su concentración, pero con ello también disminuye su factor de protección solar, en la actualidad este problema está siendo superado con las nuevas formulaciones micronizadas. (Gilaberte et al., 2003d, p.277)

1.11.2 Filtros químicos

Los filtros químicos u orgánicos tienen un mecanismo de acción muy diferente al de los filtros inorgánicos. Son compuestos orgánicos aromáticos, que pueden absorber la radiación ultravioleta. El mecanismo de acción consiste en que la energía absorbida se emite nuevamente como radiación térmica inocua para la piel. En función de la longitud de onda absorbida se distingue entre los filtros UVB, UVA y de amplio espectro. (Kullavanijaya y Lim, 2005, pp.942-943)

Dado que pueden absorberse por la piel, hay riesgo de intolerancia cutánea, por lo que no se recomienda su aplicación en niños, pieles lesionadas donde haya riesgo de absorción (cicatrices recientes, quemaduras, tratamientos pos láser), pieles intolerantes, etc. Este tipo de filtros solares son los más difundidos en el mercado porque son transparentes, no manchan la ropa y necesitan una capa de aplicación de menor grosor. (Gilaberte y González, 2010a, pp. 660-661)

- **Filtros químicos UVB.**

Los fotoprotectores UVB incluyen el ácido paraaminobenzoico (PABA) y sus ésteres (padimato A y O), los cinamatos, los salicilatos y el octocrileno. Todos ellos bloquean de forma eficaz alrededor del 90 % de las radiaciones UVB en su espectro completo (290-320 nm) y, por tanto, ofrecen protección frente a la quemadura y el eritema inducidos por estas radiaciones. (DeBuys et al., 2000c, p.582)

El PABA y sus derivados fueron los primeros en utilizarse de forma generalizada, pero pronto su uso se limitó debido a las frecuentes reacciones cutáneas adversas que provocaban. En la actualidad, los cinamatos se han convertido en el ingrediente más común de los fotoprotectores de UVB. (DeBuys et al., 2000d, p.583)

Los salicilatos absorben menos la radiación UVB que los dos grupos anteriores, pero su perfil de seguridad es excelente y solubilizan otros ingredientes de los fotoprotectores, como la avobenzona y la oxibenzona. El octocrileno, químicamente emparentado con los cinamatos, es muy fotoestable y aumenta la resistencia del fotoprotector al agua. (Gilaberte et al., 2003e, p.281)

- **Filtros químicos UVA.**

La mayoría de los filtros de la radiación UVA absorben también algo de UVB. Incluyen las benzofenonas, las antralinas, la avobenzona y el ácido tereftalideno-dialcanfor sulfónico (Mexoryl SX). La oxibenzona es la benzofenona más utilizada y absorbe los UVB y los UVA cortos. Sin embargo, la avobenzona y el Mexoryl SX absorben todo el espectro de radiación UVA, si bien la avobenzona es muy poco fotoestable y el Mexoryl SX mucho (hasta 3 h). Los derivados del alcanfor no están autorizados en Estados Unidos, pero sí en Europa (Gasparro, 2000, pp.71-72)

1.11.3 Filtros biológicos

Son sustancias antioxidantes que evitan la formación de radicales libres y, por lo tanto, potencian el subsistema inmunológico cutáneo disminuyendo el estrés oxidativo producido por la radiación ultravioleta. Se emplean cada vez con mayor abundancia, y las vitaminas A (β -carotenos), B5 (pantenol) y E (α -tocoferol) son las más utilizadas (en forma de acetato o palmitato). Investigaciones recientes han demostrado que estas vitaminas, aplicadas por vía tópica, tienen propiedades antioxidantes y actúan contra el envejecimiento cutáneo y los cánceres de piel fotoinducidos, que en numerosas ocasiones son consecuencia, a largo plazo, de una exposición prolongada al sol. (Burnett et al., 2012a, p.247)

Los antioxidantes no influyen directamente en el FPS; únicamente contrarrestan los efectos de la radiación. La combinación de filtros químicos UVA/UVB y antioxidantes da lugar a preparados de amplio espectro de protección solar y elevada eficacia. (Burnett et al., 2012b, p.244)

1.12 Factor de protección solar

La Food and Drug Administration (FDA) aprobó la determinación del factor de protección solar (FPS) como la técnica de referencia para valorar la eficacia de los protectores solares contra la quemadura solar por exposición a radiación solar UVB.

El factor de protección solar 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 del filtro solar. Una persona que presenta eritema y signos de quemadura con una hora de exposición solar, al usar un filtro con factor de protección solar 4 (FPS 4) desarrollaría eritema sólo al exponerse al sol durante cuatro horas seguidas. (Moreno y Moreno, 2010c, p.32)

Este factor se calcula dividiendo la dosis eritematogena mínima (DEM) con la aplicación del filtro solar, entre la DEM sin filtro solar. Cuanto más alto es el FPS, más alta es la protección de los rayos solares. (Colegio de Farmacéuticos de Barcelona, 2016)

El factor de protección solar (FPS) mide principalmente la protección frente a la radiación UVB. Un FPS 25 protege contra el 92% de la luz UVB, en comparación con el FPS 30 que protege contra más del 97,5%; mientras que el FPS 50 bloquea aproximadamente el 99% de esta radiación. Un protector solar ideal debe tener, por lo menos, un FPS 30+ y que, al adicionarle filtros UVA, se potencia su eficacia contra el espectro de radiación ultravioleta. (Skin Cancer Foundation, 2016c)

Se ha presentado mucha controversia sobre la forma como se determina dicho factor de protección, debido a que no se evalúa el espectro de acción para la inducción del cáncer de piel en humanos. Otro punto es que la determinación del factor de protección solar *in vivo* se hace sólo con la aplicación cutánea de 2 mg/cm², pero algunos estudios han demostrado que las personas realmente no usan esa dosis e, inclusive, usan en promedio menos de 1,5 mg/cm². Esto significa que la protección solar es significativamente menor. (Osterwalder y Herzog, 2009, pp.13-14)

Tabla 5-1. Categorías de FPS según COLIPA

Categoría	Factor de Protección Solar (FPS)
Bajo	2 – 4 – 6
Medio	8 – 10 – 12
Alto	15 – 20 – 25
Muy alto	30 – 40 – 50
Ultra	Superior a 50

FUENTE: Sociedad Argentina de Dermatología, 2012

Tabla 6-1. Categorías de FPS según FDA

Categoría	Factor de Protección Solar (FPS)
Mínima	2 – 4
Moderada	4 – 8
Alta	8 – 12
Muy alta	12 – 20
Ultra alta	20 – 30

FUENTE: Sociedad Argentina de Dermatología, 2012

1.13 Flavonoides en plantas

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas o la polución ambiental, entre otros. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. (Martínez et al., 2002b, pp.271-272)

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C₆-C₃-C₆, los cuales pueden formar o no un tercer anillo. Se originan mediante una ruta biosintética mixta, a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. (Martínez et al., 2002c, p.272)

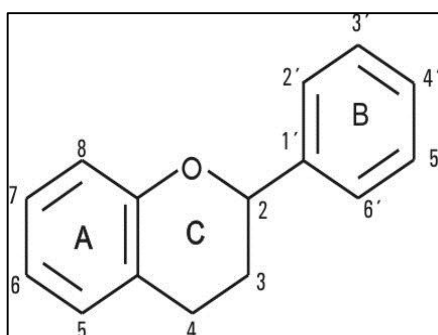


Figura 2-1. Estructura básica de los flavonoides
FUENTE: Martínez et al, 2002

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y poseen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo. Además, tienen efectos terapéuticos antiinflamatorios, inmunomoduladores, anticancerígenos, fotoprotectores y propiedades antioxidantes. Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad. (Kumar y Pandey, 2013a, pp.1-2)

Se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres. Los glicósidos son más solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, agua; pero menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo. (Kumar y Pandey, 2013b, p.3)

En función de sus características estructurales, los flavonoides se pueden clasificar en:

1) flavanos, como la catequina;

- 2) flavonoles, representados por la quercetina;
- 3) flavonas, como la diosmetina, y
- 4) antocianidinas. (Martínez et al., 2002d, p.273)

1.13.1 Flavonoides con actividad fotoprotectora

En cuanto a sus efectos fotoprotectores, los flavonoides de un lado absorben la radiación UV, de otro poseen actividad antioxidante directa e indirecta y, por último, modulan diversas vías de señalización. (Kumar y Pandey, 2013c, p.5) Entre los principales flavonoides que han demostrado algún efecto fotoprotector tenemos los siguientes.

- Genisteína: es la isoflavona de la soja, un antioxidante potente e inhibidor de la tirosin quinasa. Ha demostrado, tanto in vitro como in vivo, bloquear la radiación UVA y UVB y tiene efectos antifotocarcinogénicos y antifotoenvejecimiento. La aplicación tópica de genisteína en animales de experimentación tras la exposición a radiación UV reduce la inflamación, protege frente a la fotoinmunosupresión e inhibe la formación de tumores. Aplicado en la piel humana una hora antes de la exposición reduce el eritema. Algo interesante de la genisteína es que mantiene su efecto protector del daño solar incluso aplicándolo de 1 a 4 horas después de la exposición. (Gilaberte y González, 2010b, p.664)
- Silimarina: consiste en la mezcla de tres flavonoides silibinin, silidianin y silicristin. La silimarina ha demostrado modular un buen número de efectos agudos y crónicos de la radiación UV en ratones. Así, protege frente a la quemadura solar, el daño en el ADN y la fotoinmunosupresión. Estos estudios indican que posee unas excelentes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras que le hacen prevenir el cáncer cutáneo inducido por la radiación UVB en modelos animales. (Gilaberte y González, 2010c, p.664)
- Quercetina: es el flavonoide de propiedades antioxidantes más potentes. No hay muchos estudios en materia de fotoprotección, no obstante algunas formulaciones tópicas de quercetina han demostrado inhibir el daño inducido por la radiación UVB en animales. (Gilaberte y González, 2010d, p.665)

1.14 Extracto vegetal

Un extracto vegetal es una mezcla compleja de múltiples compuestos químicos o metabolitos secundarios que puede ser obtenida por procesos físicos, químicos o microbiológicos a partir de una fuente natural. (Miranda, 2000a, pp.45-46)

El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden obtener extractos diferentes con principios activos variados; esto depende de la polaridad de los solventes empleados en la extracción. Los extractos de plantas se diferencian no solamente por el solvente empleado, sino también por el método de extracción y el tipo de acondicionamiento o tratamiento que el material vegetal recibió con anterioridad. (Osorio, 2009a, p.28)

La extracción a partir de un material vegetal con un solvente primario proporciona, en primer lugar, un extracto bruto no tratado. Sin embargo, si este extracto bruto adicionalmente es purificado mediante la eliminación de compuestos químicos no deseados, o bien, mediante la concentración de principios activos importantes deseados; al final se podrán obtener extractos especiales con características óptimas, a diferencia del extracto bruto. (Osorio, 2009b, p.30)

La industria farmacéutica y cosmética, diferencia entre distintos tipos de extractos, entendiendo por extracto aquella preparación de consistencia líquida (extractos fluidos y tinturas) o semisólida (extractos blandos o densos), o sólida (extractos secos), obtenida a partir de drogas vegetales en estado generalmente seco. (Vega, 2013, pp.6-8)

La droga vegetal a ser extraído debe someterse a un tratamiento preliminar, como por ejemplo, secado, inactivación de enzimas, molienda o trituración. Además, las materias indeseables o impurezas deben ser eliminadas antes de la extracción. En muchos casos el extracto vegetal puede tener una actividad terapéutica mayor que el principio activo aislado y purificado. (Miranda, 2000b, p.46)

1.15 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica analítica que tiene como objetivo el análisis de una solución mediante la separación de sus componentes. Esta técnica básicamente consiste en tres etapas: sembrado o manchado, desarrollo y visualización o revelado. (UNAM, 2007a)

En TLC, la fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar mientras que la fase móvil será por lo general menos polar, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. (UNAM, 2007b)

La fase estacionaria consiste en una capa delgada de un adsorbente depositada sobre un soporte plano como una placa de vidrio, o una lámina de aluminio o de plástico. Los dos adsorbentes más ampliamente utilizados son el gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambos de carácter polar. (Martínez, et al., 2008a, pp.15)

La fase móvil generalmente es la combinación de disolventes o eluyentes con distinta polaridad en diferentes proporciones; para compuestos poco polares se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano, en el caso de compuestos con polaridad media se aconseja utilizar mezclas de hexano con acetato de etilo, mientras que productos más polares requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano con metanol. (Martinez et al., 2008b, p.15)

La solución a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación.

La TLC permite identificar los compuestos presentes en la solución analizada mediante el cálculo del R_f (factor de retardo o retención) que es igual a la relación entre la distancia recorrida por el compuesto dividida para la distancia recorrida por el disolvente; cada compuesto tiene un valor de R_f específico en las condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha, si ésta es excesivamente grande se obtendrá un valor erróneo del R_f . (UNAM, 2007c)

La mayoría de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los componentes activos a la luz ultravioleta (254 o 365 nm). En el caso de componentes que no absorban a la luz ultravioleta, la visualización requiere utilizar agentes reveladores que reaccionan con los productos proporcionando productos coloreados. (Martinez et al., 2008c, p.16)

1.16 Liofilización

La liofilización es un proceso de secado utilizado en la industria de alimentos, farmacéutica y biotecnológica, con el fin de estabilizar y conservar los productos, reduciendo las pérdidas de compuestos lábiles responsables de la actividad terapéutica en el caso de extractos vegetales. El proceso de liofilización consiste en eliminar el solvente de los extractos mediante congelación a temperatura bajas, seguido de una sublimación del solvente congelado bajo presión reducida., que pasa directamente del estado sólido a vapor. (Orrego, 2008a, p.49)

En este proceso de secado los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades químicas y se rehidratan fácilmente; además se conservan con muy bajo peso y a temperatura ambiente sin riesgo de proliferación de microorganismos debido a la baja actividad de agua que presentan. (Orrego, 2008b, pp.49-50)

Gracias al proceso de liofilización se pueden obtener extractos secos de especies vegetales; estos extractos se obtienen por evaporación total del solvente y tienen una consistencia de polvo. Presentan una concentración muy superior de principios activos que la droga original. Son preparados bastante estables (aunque en muchas ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación que se pueden utilizar para preparar tinturas, extractos fluidos, etc. (Miranda, 2000c, p.46)

1.17 Estándar McFarland

La escala de McFarland, es utilizada como estándar de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Los estándares de turbidez se preparan mezclando compuestos químicos que precipitan para formar una solución de turbidez reproducible. El estándar McFarland se realiza adicionando ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario, esta reacción provoca la formación de un precipitado de sulfato de bario. (Rojas, 2011a, p.43)

Cada uno de los tubos del patrón McFarland de acuerdo a su turbidez, representa un número o concentración de microorganismos; de esta forma al comparar una suspensión de bacterias con el tubo del patrón de McFarland que más se asemeje se puede saber aproximadamente el número de bacterias presentes en dicha suspensión. (Rojas, 2011b, p.44)

1.18 *Escherichia coli*

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

REINO: Bacteria

FILO: Proteobacteria

CLASE: Gammaproteobacteria

ORDEN: Enterobacteriales

FAMILIA: Enterobacteriaceae

GÉNERO: *Escherichia*

ESPECIE: *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su elevada presencia en el tracto

gastrointestinal y en las heces se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. (FAO, 2011)

E. coli es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo que no forma esporas, el tamaño promedio de estos bacilos es 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo. Estos bacilos fermentan la glucosa y la lactosa; son catalasa positivos, oxidasa negativos, reducen nitratos a nitritos y son capaces de producir vitaminas B y K. Algunas especies son móviles ya que poseen flagelos peritricos. (Rodríguez, 2002, p.465)

1.19 ATCC

ATCC (American Type Culture Collection) es una organización de recursos biológicos y materiales estándar 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. ATCC es un recurso clave para la investigación en las comunidades académicas, científicas y médicas. Es el repositorio de la cultura biológica más importante del mundo. (ATCC, 2015a, <https://www.atcc.org>)

Los microorganismos de referencia estándar o cepas ATCC son cultivos puros liofilizados con características establecidas y predecibles; estas cepas son debidamente procesadas, mantenidas y subcultivadas. Son fuentes fiables de microorganismos puros empleados en laboratorios de investigación y desarrollo para la validación de métodos, pruebas confirmatorias, control de calidad de reactivos y medios de cultivo, (ATCC, 2015b, <https://www.atcc.org>)

1.20 *Oreocallis grandiflora*



Figura 3-1. *Oreocallis grandiflora*

FUENTE: Utuana Reserve, Ecuador, 2009

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Proteales

FAMILIA: Proteaceae

GÉNERO: *Oreocallis*

ESPECIE: *Oreocallis grandiflora*

En la presente investigación se ha considerado el estudio de la especie vegetal *Oreocallis grandiflora* (cucharilla) por presentar actividades terapéuticas relevante como antioxidante, gastroprotectora e hipoglucemiante; esto se ha logrado comprobar gracias a estudios preliminares realizados en la Planta de Productos Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja y en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. La gran cantidad de flavonoides y compuestos naturales presentes en esta especie vegetal amerita profundizar en el estudio de nuevas actividades terapéuticas para mejorar la calidad de vida de las personas. Actualmente no existen estudios sobre la composición química de esta especie pero se presume que el ácido tánico es uno de sus principales principios activos. (Ríos y Acevedo, 2007, p.10)

El estudio para determinar la actividad fotoprotectora *in vitro* de los extractos de *Oreocallis grandiflora* surge de la necesidad de nuevos filtros solares naturales seguros y eficaces que protejan a la piel de la radiación solar UV, ya que nuestro país recibe dicha radiación con mayor intensidad que otros debido a varios factores como su posición geográfica, latitud y altura. (López, 2011c. p.311)

Este estudio es viable por la disponibilidad y accesibilidad de dicha especie vegetal que se puede encontrar desde el norte de Perú hasta el centro de Ecuador. Esta crece entre los 1000 y 4000 m.s.n.m., y se ha registrado en las provincias de Chimborazo, Bolívar, Azuay, Guayas, Loja y Zamora Chinchipe. (Alejandro, 2010, p.20)

1.20.1 Descripción botánica

Oreocallis grandiflora es un árbol o arbusto pruinoso que mide de 3 a 5 m de altura, sus raíces son horizontales, su tallo es cilíndrico de corteza lisa en plantas jóvenes y rugoso color café oscuro en plantas viejas y, en bosque natural pueden llegar a medir entre 10 y 15 cm de diámetro. Las hojas miden de 8-9 cm largo por 4 cm de ancho, de color verde opaco, estas pueden ser coriáceas,

lobuladas o dentadas, de pecíolo alargado y están dispuestas en espiral a lo largo de las ramas. Forma inflorescencias en racimos que miden entre 12 a 14 cm y tiene entre 60 y 80 flores de color blanco, rojizas o violáceas. Sus frutos son alargados y grandes, más o menos cilíndricos, a veces leñosos y presentan de 9 a 11 ovarios. Al madurar, los frutos exponen las semillas, que presentan un ala membranosa y son dispersadas por el viento. (Reynel, 2010, pp.123-125)

1.20.2 Usos medicinales

Empíricamente se emplean las hojas, los frutos y las flores de la planta en forma de emplasto, infusión y macerados para tratar diferentes dolencias como: cefaleas, hernias, cólicos hepáticos y renales, afecciones del tracto intestinal, colesterol, nefritis, diabetes, ulcera gástrica, inflamaciones, problemas de los ojos, y la gripe. (Espinosa et al., 2013a, p.60)

Las hojas se mastican para prevenir las caries y mantener buena dentadura. Las flores de esta planta se usan para preparar bebidas que contrarrestan fiebres, malestares de la gripe, dolencias hepáticas, nefritis, generalmente mezcladas con hojas de manzanilla y toronjil. El jugo extraído de las semillas es considerado útil en el caso de hernias aplicándolo externamente en cataplasma. (Espinosa et al., 2013b, p.60)

1.21 Antecedentes de la Investigación

El estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias inducidas por radiación solar ultravioleta UV pueden causar una variedad de efectos nocivos en la piel, incluyendo el fotoenvejecimiento prematuro, la inducción de inmunosupresión y la carcinogénesis de piel. Cada vez, más personas sufren este tipo de lesiones cutáneas ya que reciben dicha radiación con mayor intensidad como consecuencia del desgaste de la capa de ozono. (Gonçalves et al., 2013b, pp.122-123)

A través del tiempo los seres humanos han usado dos mecanismos para protegerse de los rayos ultravioleta perjudiciales; uno es el uso de barreras físicas como la ropa, gafas de sol y sombreros, éstas aunque son las formas más efectivas, no son las más cómodas y adecuadas. La segunda opción es mediante el empleo de productos cosméticos que contienen compuestos activos (cosmecéuticos) inorgánicos y/o orgánicos que actúan como filtros solares físicos y químicos respectivamente. (Mejía et al., 2014a, p.273)

Los filtros físicos aunque tienen un amplio rango de protección UV, presentan dificultades estéticas al momento de su aplicación ya que el tamaño de sus partículas genera una apariencia blanquecina en la piel y promueven comedogénesis. De igual manera, diversos estudios han mostrado evidencia suficiente sobre algunos filtros solares orgánicos, usados en formulaciones

tradicionales, que atraviesan las capas profundas de la piel presentando absorción sistémica, con las consiguientes consecuencias de pérdida de eficacia (menor FPS) y posibles efectos tóxicos. Además de que su uso habitual contamina el medio ambiente. (Palm y O'Donoghue, 2007, p.360)

Por todo lo anterior, es necesario mejorar la eficacia e inocuidad de los protectores solares buscando nuevas fuentes de compuestos fotoprotectores que puedan reemplazar o reducir el uso de los filtros usados tradicionalmente.

De igual manera que en los seres humanos, la radiación solar UV provoca un efecto dual sobre las plantas, que puede ser benéfico o perjudicial. En los vegetales, uno de los mecanismos de defensa identificados frente a la radiación UV, es la producción de compuestos polifenólicos, dentro de los cuales el grupo más caracterizado son los flavonoides. Diversas investigaciones correlacionan el aumento de la producción de flavonoides cuando la planta está bajo estas condiciones de estrés ambiental. Por tal motivo, se ha decidido profundizar en el estudio de este grupo de metabolitos secundarios, con el fin de evaluar sus posibles propiedades fotoprotectoras. (Carrasco, 2009b, pp.59-60)

En la actualidad, hay un creciente número de estudios que evalúan los efectos fotoprotectores y antioxidantes de extractos de plantas con el fin de ser incorporados en productos de uso tópico. Polifenoles del té verde, extracto de *Aloe barbadencis* y compuestos aromáticos aislados de líquenes son ejemplos de sustancias naturales evaluadas por sus propiedades de protección solar. (Avila Acevedo et al., 2005b, p.302)

Los flavonoides se han denominado pigmentos no fotosintéticos por sus efectos fotoprotectores en plantas actuando como filtros solares por absorción de los rayos UV y disipando el exceso de energía, poseen efectos antioxidantes, protegiendo así a las plantas contra el estrés oxidativo inducido por la radiación solar UV. Existe una amplia evidencia en la literatura científica acerca de los beneficios coadyuvantes en formulaciones fotoprotectoras de uso tópico. (Mejía et al., 2014b, p.277)

Las principales ventajas que presentan los flavonoides al ser usados como bioactivos fotoprotectores, son su amplia distribución en las plantas, permitiendo su fácil disponibilidad y su potencial antioxidante. Los flavonoides ofrecen protección a los tejidos fotosintéticos de las plantas frente a la radiación UV y dicho mecanismo podría ser extrapolado a la fotoprotección en humanos. La biosíntesis de flavonoides inducida por radiación UV, sugiere que la absorción de estas radiaciones nocivas puede ser una característica fotoprotectora aprovechable de estos compuestos bioactivos. (Mejía et al., 2014c, p.280)

Hoy en día, una de las tendencias de la industria farmacéutica y el mercado de los cosméticos es el desarrollo de productos fotoprotectores con el uso de recursos naturales. Varios extractos y aceites vegetales se han utilizado en productos cosméticos como protectores solares, debido a su

acción fotoprotectora. (Gonçalves et al., 2013c, p.122) Entre los extractos de plantas utilizadas como filtros solares que contienen compuestos antioxidantes, podemos mencionar las especies *Garcinia brasiliensis* y *Malpighia glabra* L. (Silva et al., 2016a, p.509)

En este contexto, el objetivo de este estudio es evaluar la actividad fotoprotectora *in vitro* de los extractos de hojas de *Oreocallis grandiflora* tomando como referencia el trabajo realizado por Ávila Acevedo que utiliza un método *in vitro* para determinar la actividad fotoprotectora de *Buddleja scrdioides* basado en la sobrevivencia de bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 luego de ser expuestas a radiación UVB simulada por una lámpara. (Avila Acevedo et al., 2005c, p.303)

Esta investigación contribuye al descubrimiento de filtros solares naturales como alternativas que pueden ser incorporadas en formulaciones farmacéuticas para evitar los efectos nocivos que provoca la radiación solar UV en la piel.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de investigación

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio Clínico de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, localizada en el cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.2 Recolección del material vegetal

El sector donde se realizó la recolección del material vegetal fue en el barrio Laurel, Parroquia Juan de Velasco, Cantón Colta, Provincia de Chimborazo a una altura promedio de 3500 m.s.n.m en las siguientes coordenadas GPS: X = 737319.461, Y = 9799062.596.

2.3 Identificación botánica y taxonómica

Dentro del marco legal de nuestro país se obtuvo la respectiva Autorización de Investigación Científica, luego de haber cumplido con todos los requisitos establecidos por el Ministerio del Ambiente del Ecuador.

Se tomaron dos muestras de plantas que fueron secadas y prensadas, para luego ser identificadas y entregadas respectivamente en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo cuyo responsable es el Ing. Jorge Caranqui.

2.4 Acondicionamiento del material vegetal

Luego de haber recolectado los mejores especímenes vegetales se procedió a lavarlos con agua potable para eliminar cualquier tipo de materias extrañas. A continuación fueron colocados sobre papel periódico para ser secados a temperatura ambiente y protegidos del sol durante un mes. Una vez seco el material vegetal, se procedió a moler en un molino de cuchilla giratoria marca Arthur H, Tomas C.O, solo aquellas hojas en buen estado con superficie integra y sin ningún tipo de manchas para obtener partículas pequeñas de 2 y 3 mm. El material triturado fue almacenado en

fundas de papel para evitar cualquier tipo de contaminación como la proliferación de hongos y conservado en un lugar fresco, seco y oscuro hasta el momento de su uso.

2.5 Control de calidad de la droga cruda

2.5.1 Determinación del contenido de humedad

Se realizó mediante el método gravimétrico que se basa en la pérdida en masa de la muestra luego de ser desecada en estufa. Para determinar este parámetro de calidad se pesaron $2 \text{ g} \pm 0.5 \text{ mg}$ de material vegetal seco y triturado, se colocaron en una cápsula de porcelana previamente tarada y se deseco en la estufa por 3 horas a $105 \text{ }^\circ\text{C}$. Una vez cumplido el tiempo, se colocó la cápsula en el desecador donde se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se pesó. Este proceso se repitió pesando la cápsula cada hora hasta que el peso fue constante. (Miranda, 2000d, p.34-35) El ensayo se realizó por triplicado y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{M2 - M1}{M2 - M} \times 100$$

Donde:

%H = pérdida en peso por desecación (%)

M2 = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M1 = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía

100 = factor matemático

2.5.2 Determinación de cenizas totales

Se realizó por determinación gravimétrica del residuo obtenido de la incineración de la muestra. Para determinar este parámetro de calidad se pesaron $2 \text{ g} \pm 0.5 \text{ mg}$ de material vegetal seco y triturado en un crisol de porcelana previamente tarado. La muestra fue calentada con un reverbero hasta quedar totalmente carbonizada, posteriormente la muestra se incinero en un horno mufla a una temperatura de $700 - 750 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo, el crisol se retiró de la mufla y se enfrió en el desecador hasta temperatura ambiente, para luego ser pesado. Este proceso se repitió a partir de la incineración de la muestra, pesando el crisol cada 30 min hasta

que el peso fue constante y el residuo de color blanco. (Miranda, 2000e, p.32) El ensayo se realizó por triplicado y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

$$\%C = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Donde:

%C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada

M2 = masa del crisol con las cenizas (g)

M1 = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

2.5.3 Determinación de cenizas solubles en agua

Se realizó mediante determinación gravimétrica. A las cenizas obtenidas en la determinación de cenizas totales se añadió de 15 a 20 mL de agua destilada, se tapó el crisol con un vidrio reloj y se hirvió suavemente durante 5 min en un reverbero. La solución se filtró a través de papel filtro libre de cenizas. El papel filtro con el residuo se transfirió al crisol inicial, en donde fue carbonizado en un reverbero y posteriormente incinerado en un horno mufla a una temperatura de 700 – 750 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo, el crisol se retiró de la mufla y se enfrió en el desecador hasta temperatura ambiente, para luego ser pesado. Este proceso se repitió a partir de la incineración de la muestra, en intervalos de 30 min hasta que el peso fue constante. (Miranda, 2000f, p.33) El ensayo se realizó por triplicado y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

$$\%Ca = \frac{M2 - Ma}{M1 - M} \times 100$$

Donde:

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

M2 = masa del crisol con las cenizas totales (g)

Ma = masa del crisol con la cenizas insolubles en agua (g)

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

2.5.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Se realizó por el método gravimétrico. A las cenizas obtenidas en la determinación de cenizas totales se añadió de 2 a 3 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 10%. El crisol tapado con un vidrio reloj se calentó en baño de agua hirviendo durante 10 min. El vidrio reloj se lavó con 5 mL de agua caliente y se unió al contenido del crisol. La solución se filtró a través de un papel filtro libre de cenizas y se lavó el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico (al filtrado se le añadió una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1 M) no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo fueron desecados en una estufa a 100 – 105 °C de temperatura, luego transferidos al crisol inicial y posteriormente incinerados en un horno mufla a una temperatura de 700 – 750 °C durante 2 horas. Una vez cumplido el tiempo, el crisol se retiró de la mufla y se enfrió en el desecador hasta temperatura ambiente, para luego ser pesado. Este proceso se repitió a partir de la incineración de la muestra, pesando el crisol cada 30 min hasta que se obtuvo un peso constante. (Miranda, 2000g, p.33) El ensayo se realizó por triplicado y posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

$$\%B = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Donde:

%B = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada

M = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M2 = masa del crisol con las cenizas (g)

100 = factor matemático

2.6 Tamizaje fitoquímico

Luego de haber realizado el control de calidad de la droga cruda (material vegetal seco y triturado) se procedió a identificar cualitativamente los componentes químicos presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* mediante screening o tamizaje fitoquímico para lo cual se realizaron tres extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente: éter etílico, etanol y agua respectivamente; como se indica a continuación en el Gráfico 1-2.

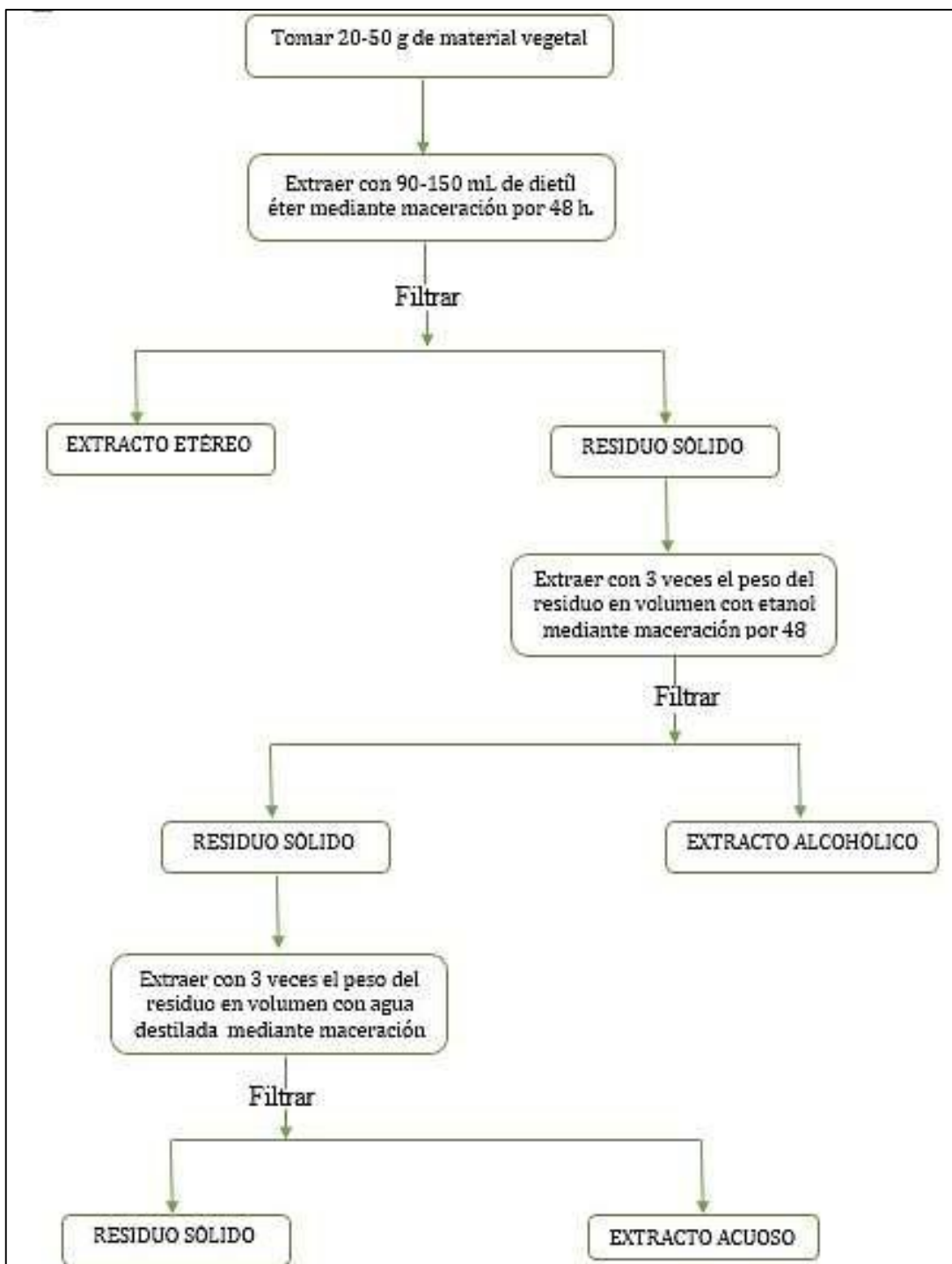


Gráfico 1-2. Preparación de extractos para realizar el tamizaje fitoquímico

FUENTE: Miranda, 2000

Luego de haber obtenido los diferentes extractos vegetales se procedió a realizar a cada extracto por separado las reacciones de caracterización correspondientes como se indica a continuación en los Gráficos 2-2, 3-2 y 4-2.

Mediante estas reacciones selectivas se logró identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* por precipitación y/o coloración

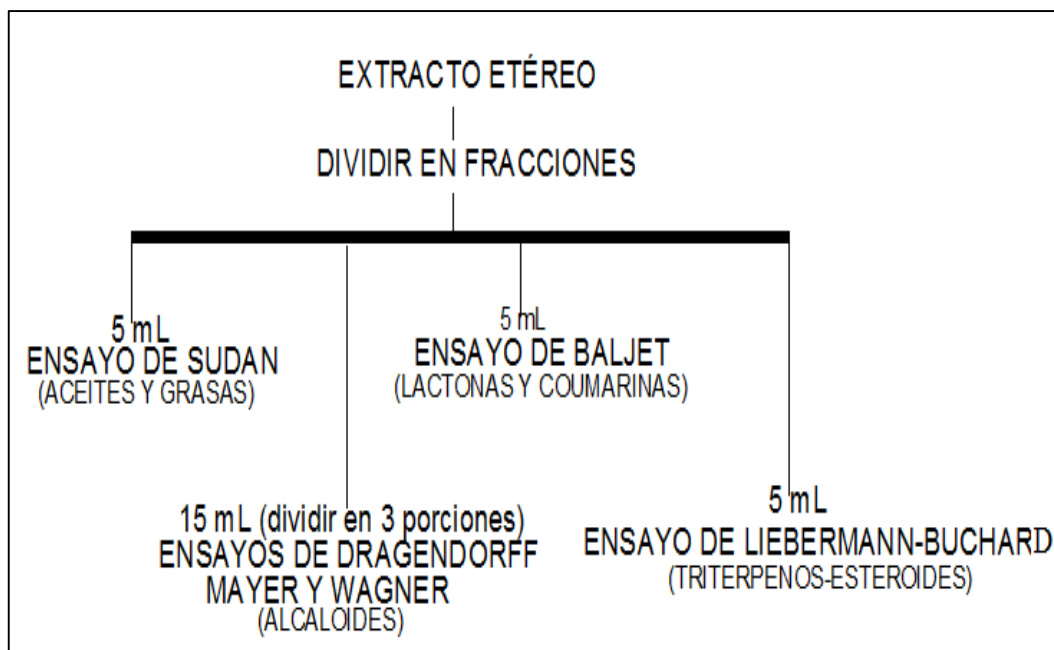


Gráfico 2-2. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo

FUENTE: Miranda, 2000

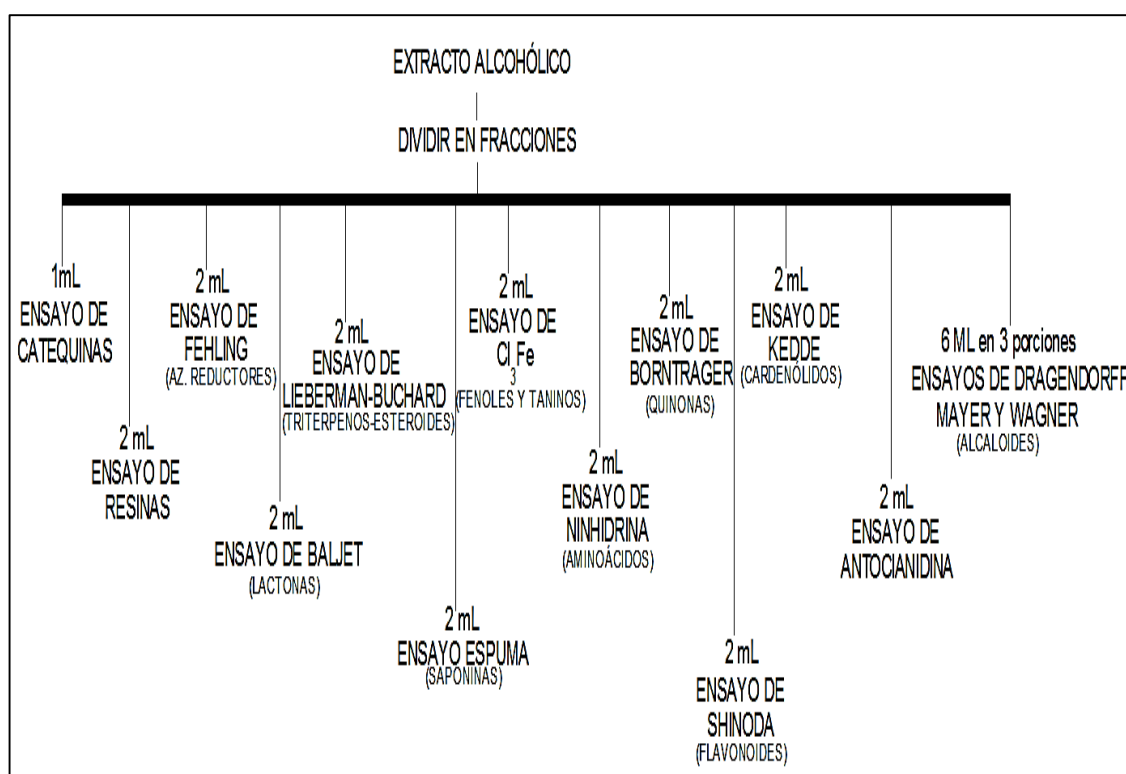


Gráfico 3-2. Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico

FUENTE: Miranda, 2000

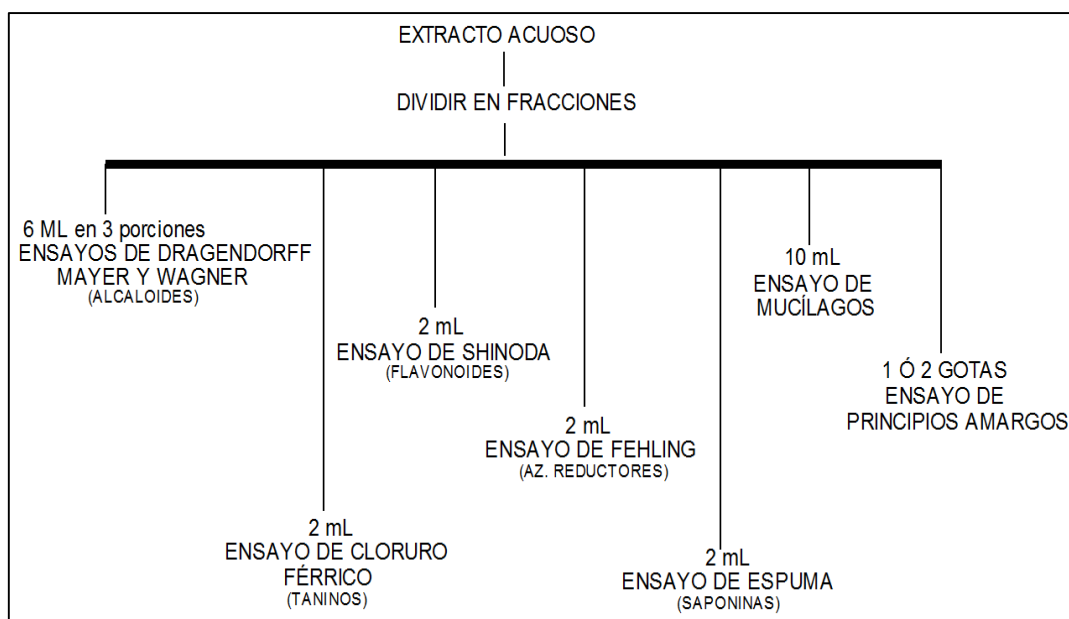


Gráfico 4-2. Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso

FUENTE: (Miranda, 2000)

2.7 Obtención del extracto seco de hojas de *Oreocallis grandiflora*

En un tubo con tapa rosca se colocó 1 g de droga vegetal seca y triturada, 10 mL de n-hexano y 10 mL de etanol al 70%. El tubo con la mezcla fue sometido a agitación continua en el vórtex durante 15 min (proceso de extracción). Luego el contenido del tubo fue filtrado al vacío, lavando el residuo sólido sobrante con 10 mL de n-hexano y 10 mL de etanol al 70%. El residuo sólido fue desechado. El filtrado se transfirió a un embudo de separación, se añadió 10 mL n-hexano y se agitó vigorosamente para eliminar clorofilas y ser desengrasado. El embudo se dejó en reposo y una vez separadas las 2 fases, se procedió a recoger la fase hidroalcohólica en un frasco de vidrio ámbar con tapa; mientras que la fase orgánica fue recogida en otro frasco de vidrio para luego proceder a recuperar el solvente (n-hexano) por destilación controlada. Este proceso se realizó 10 veces; es decir, en total se realizaron 10 extracciones, cada una a partir de 1 g de droga vegetal seca y triturada.

La fase hidroalcohólica obtenida de las 10 extracciones se colocó en un balón de 250 mL y se concentró en un rotavapor a 60 °C y presión reducida, hasta evaporar el etanol por completo. El siguiente paso que se realizó fue congelar el concentrado y posteriormente se eliminó el agua por liofilización manteniendo congelado el concentrado con nitrógeno líquido. Al final del proceso se obtuvo el extracto seco de hojas de *Oreocallis grandiflora* como un polvo fino y homogéneo de color amarillo y consistencia sólida.

2.8 Cromatografía en capa fina

Los flavonoides presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* fueron identificados mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 F254 marca Merck de 10 cm de largo por 5 cm de ancho; como fase móvil el sistema de solventes compuesto por Acetato de etilo: Ácido acético: Ácido fórmico: Agua en una proporción (10: 1.1: 1.1: 2.6) mL respectivamente; como revelador se empleó Cloruro de Aluminio al 1% en metanol y como potenciador de fluorescencia PEG 400 al 5% en metanol. (Wagner et al., 2001a, pp.210-211)

Se disolvieron 20 mg de extracto seco en 10 mL de etanol al 70% (2000 ppm) mediante agitación magnética por 15 min; una vez disuelto se procedió a sembrar 20 µL de la muestra a 1 cm de distancia del borde inferior de la placa cromatográfica y se dejó secar. La placa sembrada fue colocada en el interior de la cuba que contenía la fase móvil. Luego del desarrollo de la cromatografía se dejó secar la placa al ambiente para luego ser revelada con Cloruro de Aluminio (AlCl₃) al 1% y después ser sumergida en PEG 400 al 5% para mejorar su fluorescencia dejando secar la placa al ambiente después de realizar cada uno de estos pasos. La placa fue sometida a calor y finalmente con la lámpara UV largo (365 nm) se pudieron visualizar manchas redondas de color verde. Los valores de R_f para cada una de las manchas se calcularon con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

2.9 Preparación del estándar McFarland

El patrón McFarland fue usado para estandarizar la concentración de las suspensiones bacterianas utilizadas en el ensayo de fotoprotección mediante la comparación de su turbidez. Se preparó el estándar McFarland No 0.5 que corresponde a una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL, para lo cual se mezcló 0.5 mL de Cloruro de Bario (BaCl₂) al 1% con 9.95 mL de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) al 1%, esta reacción produjo Sulfato de Bario precipitado dando como resultado una solución blanquecina turbia. (Rojas, 2011c, p.43)

Para comprobar la exactitud de la turbidez se realizó el control de calidad del estándar McFarland por espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm; para el estándar McFarland No 0.5 este valor debe estar entre 0.08 – 0.1. (Prolab Diagnostics, 2015a)

Para determinar el No de estándar McFarland que corresponde a la suspensión, el valor de su absorbancia se reemplazó en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración realizada con el estándar McFarland No 1, 2, 3, 4. (Urbina, 2015, pp.31-32)

Tabla 1-2. Preparación del estándar McFarland

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

FUENTE: Prolab Diagnostics, 2015

2.10 Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida

Una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 se cultivó en caldo de infusión cerebro corazón y luego en agar Mueller Hinton para su reactivación. El ensayo de actividad fotoprotectora se realizó al extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora*. Para preparar la solución de 2000 ppm se disolvieron 50 mg de extracto seco en 25 mL de etanol al 70%; las soluciones de 200 y 20 ppm se prepararon por diluciones a partir de la solución de 2000 ppm y 200 ppm respectivamente. Se colocaron 5 mL de cada uno de los extractos de diferente concentración en tubos de cuarzo de 1 cm de diámetro. Las suspensiones bacterianas de concentración 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) se realizaron de igual manera en tubos de cuarzo de 1 cm de diámetro con 5 mL de solución salina (cloruro de sodio) al 0.9%. (Avila Acevedo et al., 2005d, p.303)

Un tubo con la suspensión bacteriana fue colocado detrás de cada uno de los tubos que contenían la sustancia fotoprotectora de esta manera ambos tubos formaron una unidad experimental. Las unidades experimentales fueron irradiadas con una lámpara de UVB marca Philips Broadband TL 40w/12 RS a una dosis de radiación de 0.60 J/cm^2 . Se detectó el número de UFC sobrevivientes a la radiación UVB sembrando $5 \mu\text{L}$ de la suspensión bacteriana en agar nutritivo Mueller Hinton cada 30 minutos por 3 horas; En el tiempo 0 y 1 las bacterias se sembraron luego de realizar diluciones con solución salina 0.9%. (Avila Acevedo et al., 2005e, p.303)

El ensayo se realizó por triplicado a cada uno de los extractos con concentración diferente y de igual forma a los controles positivos Octilmetoxicinamato (OMC) y Pamidato-O a las mismas

concentraciones propuestas anteriormente. El blanco fue etanol al 70% utilizado para disolver las sustancias fotoprotectoras.

2.11 Determinación del factor de protección solar (FPS) *in vitro*

Se determinó el FPS *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* de concentración 10 ppm y de los controles positivos (OMC y Pamidato) a la misma concentración. El blanco fue etanol al 70 % utilizado para disolver las sustancias fotoprotectoras.

Se realizó un análisis espectrofotométrico registrando las absorbancias a longitudes de onda (λ) entre 290 a 320 nm, con intervalos de 5 nm; utilizando el espectrofotómetro UV Cole Parmer S-2150 y celdas de cuarzo de 1 cm. (Gonçalves et al., 2013d. p.124) El cálculo del FPS *in vitro* del extracto etanólico y de los controles positivos a 10 ppm se realizó mediante la siguiente ecuación propuesta por Mansur en el año 1986:

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

Donde:

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 la relación entre el efecto eritemal y la intensidad de la radiación para cada longitud de onda EE (λ) x I (λ) son constantes como se indica a continuación:

Tabla 2-2. Valores de EE x I preestablecidos

Table. 2: Normalized product function used in the calculation of SPF.	
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 – erythema effect spectrum; I – Solar intensity spectrum.

FUENTE: (Sayre et.al, 1979)

2.12 Determinación del contenido de flavonoides totales

Se cuantificaron los flavonoides totales presentes en el extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* a 2000 ppm para lo cual se disolvieron 20 mg de extracto seco en 10 mL de etanol al 70%. La determinación se realizó de la siguiente manera:

- Una alícuota (50 μ L) del extracto etanólico se mezcló con 300 μ L de solución de Nitrito de Sodio (NaNO_2) al 5% p/v y con 4 mL de agua destilada.
- Se agito la mezcla y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz
- Luego de incubar la mezcla se agregaron 300 μ L de solución de Cloruro de Aluminio (AlCl_3) al 10% p/v.
- Se agito la mezcla y se dejó reposar 6 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz
- Como siguiente paso se adicionaron 2 mL de solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M
- Se volvió a agitar la mezcla y se dejó reposar otros 5 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz
- Finalmente se procedió a registrar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm; el blanco utilizado se preparó de la misma manera que la solución a analizar con todos los reactivos excepto la sustancia fotoprotectora. (Wu y Ng, 2008b, p.325)

El contenido de flavonoides totales se expresaron como mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco de hojas de *Oreocallis grandiflora* (mg EQ/g) y fueron calculados mediante la ecuación de la recta $A = 0.001 C + 0.0015$ obtenida a partir de la curva de calibración del estándar de quercetina que fue elaborada con soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm en metanol al 98%; con un coeficiente de correlación ($R^2 = 0.9948$) (Chávez, 2016a)

El ensayo se realizó por triplicado; los cálculos se realizaron despejando la concentración en la ecuación de la recta, reemplazando el valor de la absorbancia y multiplicando el resultado obtenido por el factor de dilución empleado.

2.13 Barrido espectral UV

A partir del extracto seco de hojas de *Oreocallis grandiflora* se prepararon extractos con agua, etanol y cloroformo (solventes de diferente polaridad) a las concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm; el análisis espectrofotométrico se realizó a cada uno de los extractos y controles positivos con diferente concentración; el blanco utilizado fue el solvente usado para disolver el extracto seco en la preparación de cada tipo de extracto.

Con el espectro de barrido de cada extracto a la concentración adecuada se identificaron los posibles compuestos presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* responsables del efecto

fotoprotector, los cuales presentan máximos de absorción en una longitud de onda entre 290 y 320 nm, rango que corresponde a la radiación UVB.

Tabla 3-2. Bandas de absorción UV para flavonoides

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

FUENTE: (Lock, 1994)

2.14 Análisis estadístico de datos

Los datos del número de unidades formadoras de colonias (UFC) sobrevivientes obtenidos por triplicado en la determinación de la actividad fotoprotectora del extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* fueron transformados en términos de porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* para el respectivo análisis estadístico que se realizó con todos los datos para cada concentración de extracto tomando como referencia los resultados de los controles positivos (OMC y Pamidato-O) a 20 ppm.

La valoración de la actividad fotoprotectora se realizó mediante el programa estadístico IBM SPSS STATISTICS 21 y MINITAB 17 aplicando la prueba estadística de normalidad de Shapiro Wilk, prueba estadística de homogeneidad de varianzas de Levene, Anova de un factor y prueba de Tukey con todas las concentraciones propuestas.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de la droga cruda

Luego de someter la droga cruda a las pruebas de control de calidad descritas anteriormente en el Capítulo II, se obtuvieron los resultados expresados a continuación.

Tabla 1-3. Resultados del control de calidad de la droga cruda

PARÁMETRO	<i>Oreocallis grandiflora</i>	LÍMITES ACEPTADOS (Real Farmacopea Española 2002)
Contenido de Humedad	11.12 %	14 %
Contenido de Cenizas Totales	2.31 %	5 %
Contenido de Cenizas Solubles en Agua	0.41 %	2 %
Contenido de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico	0.02 %	1%

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

3.1.1 Determinación del contenido de humedad

Como requisito previo para realizar la presente investigación fue necesario comprobar que la droga vegetal se encuentre en óptimas condiciones mediante el control de calidad de la misma. El contenido de humedad se determinó por el método gravimétrico de secado en estufa con circulación de aire caliente; para las hojas de *Oreocallis grandiflora* el valor de este parámetro de calidad fue de 11.12%, este porcentaje de humedad obtenido se encuentra dentro los límites establecidos por la Real Farmacopea Española 2002 donde se indica un valor máximo de hasta 14% (Tabla 1-3). El bajo contenido de humedad o baja actividad de agua permite ralentizar el proceso la degradación de metabolitos y principios activos por hidrólisis de los mismos, así como también ayuda a prevenir la proliferación de hongos y bacterias; de esta manera se pudo garantizar la estabilidad y calidad de la droga vegetal durante el desarrollo de esta investigación. (Miranda, 2000h, pp.34-35)

3.1.2 *Determinación de cenizas totales*

El contenido de cenizas totales en la droga vegetal se determinó por el método gravimétrico que se basa en el residuo obtenido luego de incinerar la muestra. El valor de este parámetro de calidad para las hojas de *Oreocallis grandiflora* fue de 2.31%, este porcentaje se encuentra dentro de los límites establecidos por la Real Farmacopea Española 2002 que indica un valor máximo permisible de hasta 5% (Tabla 1-3), si los valores superan a los límites establecidos la muestra vegetal debe ser rechazada por una excesiva contaminación con materia inorgánica o mineral proveniente de la tierra durante los procesos de recolección y almacenamiento de la misma. Un bajo porcentaje de cenizas totales garantiza la calidad e identidad de la droga vegetal y además descarta cualquier tipo de interferencia en la investigación por contaminación con metales pesados y residuos inorgánicos como carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice; la materia mineral puede ser responsable de algún tipo de actividad farmacológica no deseada proporcionando de esta manera resultados falsos positivos o negativos. (Miranda, 2000i, p.32)

3.1.3 *Determinación de cenizas solubles en agua*

El contenido de cenizas solubles en agua se determinó mediante el método gravimétrico. El valor de este parámetro de calidad para las hojas de *Oreocallis grandiflora* fue de 0.41%, este porcentaje se encuentra dentro de los límites establecidos por la Real Farmacopea Española 2002 que indica un valor máximo permisible de hasta 2% (Tabla 1-3). Este tipo de cenizas fisiológicas corresponden a las sales solubles y compuestos naturales presentes en la muestra vegetal. El bajo porcentaje de cenizas solubles obtenido confirma que la muestra vegetal no está contaminada con sales minerales o restos inorgánicos extraños provenientes de la tierra; es decir la droga vegetal está en óptimas condiciones para realizar la presente investigación. (Miranda, 2000j, p.33)

3.1.4 *Determinación de Cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Esta determinación se realizó por el método gravimétrico. El valor de cenizas insolubles en ácido clorhídrico para las hojas de *Oreocallis grandiflora* fue de 0.02%, dicho porcentaje se encuentra dentro de los límites establecidos por la Real Farmacopea Española 2002 y demás estudios similares, que señalan un límite máximo permisible de hasta 1% (Tabla 1-3). Este parámetro de calidad sirve para determinar la presencia de sílice por contaminación de la muestra vegetal con tierra silíceas y arena debido a una mala recolección e inadecuado almacenamiento de la misma. Al cumplir con todos los parámetros de calidad, la droga vegetal presentó las condiciones adecuadas para realizar el presente estudio. (Miranda, 2000k, p.33)

3.2 Tamizaje fitoquímico

La identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* se realizó mediante el tamizaje fitoquímico, mismo que consiste en una serie de reacciones de coloración y precipitación que permiten determinar la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos en determinados compuestos naturales. Para lograr una mayor extracción de estos compuestos, a partir del extracto seco se realizaron extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente: éter etílico, etanol y agua respectivamente, los mismos que provocaron un cambio de pH del medio y extrajeron los metabolitos según su solubilidad y polaridad; en este sentido el éter etílico extrae compuestos liposolubles, el etanol compuestos con polaridad media y el agua compuestos polares incluso hasta en su forma ionizada. (Miranda, 2000l, pp. 38-45)

Gracias a los resultados del tamizaje fitoquímico se pudo confirmar en el extracto etéreo la presencia de una cantidad moderada de triterpenos y esteroides así como también cantidades relativamente pequeñas de aceites, lactonas y coumarinas. En el extracto alcohólico destaco la presencia de grandes cantidades de compuestos fenólicos principalmente flavonoides y antocianidinas; además se pudieron evidenciar cantidades moderadas de triterpenos, esteroides, azúcares reductores, saponinas; y un escaso contenido de catequinas y quinonas (Tabla 2-3). El extracto acuoso simplemente ratifico la presencia de compuestos fenólicos de interés terapéutico en esta droga vegetal; especialmente flavonoides que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, anticancerígenas y sobre todo fotoprotectoras frente a radiación solar UVB las mismas que fueron evaluadas en el presente estudio. (Kumar y Pandey, 2013d, pp.1-2)

La presencia de alcaloides en la droga vegetal es nula ya que no pudieron ser evidenciados en ninguno de los extractos luego de haber realizado los ensayos correspondientes para este tipo de metabolitos secundarios. Finalmente cabe resaltar que en la actualidad no existen estudios fitoquímicos de rigor científico para esta especie vegetal; estudios realizados a *Grevillea robusta* demuestran que las plantas que pertenecen a la familia Proteaceae poseen grandes cantidades de flavonoides, hecho que concuerda con los resultados obtenidos para las hojas *Oreocallis grandiflora*.

Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de *Oreocallis grandiflora*

ENSAYO	TIPO DE METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Aceites y grasas	+	N/A	N/A
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-
Mayer	Alcaloides	-	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-	-
Baljet	Lactonas y coumarinas	+	+	N/A
Lieberman - Burchard	Triterpenos y esteroides	++ (verde oscuro)	++ (verde oscuro)	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	+	N/A
Resinas	Resinas	N/A	-	N/A
Fehling	Azucares reductores	N/A	++	++
Espuma	Saponinas	N/A	++	++
Cloruro Férrico (FeCl₃)	Compuestos fenólicos	N/A	+++ (verde intenso)	+++ (verde intenso)
Borntrager	Quinonas	N/A	+	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	+++ (naranja intenso)	+++ (naranja intenso)
Antoncianidina	Antocianidinas	N/A	++ (rojo)	N/A

+++ (Abundante), ++ (Moderado), + (Escaso), - (Ausencia), N/A (No Aplica)

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

3.3 Extracto seco de hojas de *Oreocallis grandiflora*

Luego de obtener el extracto alcohólico de las hojas de *Oreocallis grandiflora* con etanol al 70% libre de clorofilas y desengrasado con n-hexano, se eliminó el etanol por concentración en rotavapor hasta obtener un extracto acuoso, el mismo que fue congelado y liofilizado logrando

conseguir un extracto seco de gran estabilidad por eliminación del agua. A partir de 10 g de droga vegetal seca y triturada se obtuvieron 2.1592 g de extracto en forma de polvo fino homogéneo de color amarillo; por lo tanto, el rendimiento de extracción por este método fue de 21.59%. Como las sustancias termolábiles pueden desnaturalizarse durante la obtención de extractos secos, actualmente se recurre al proceso de liofilización que respeta el contenido químico, enzimático, vitamínico y hormonal original de la especie vegetal. (Miranda, 2000m, p.46)

3.4 Cromatografía en capa fina

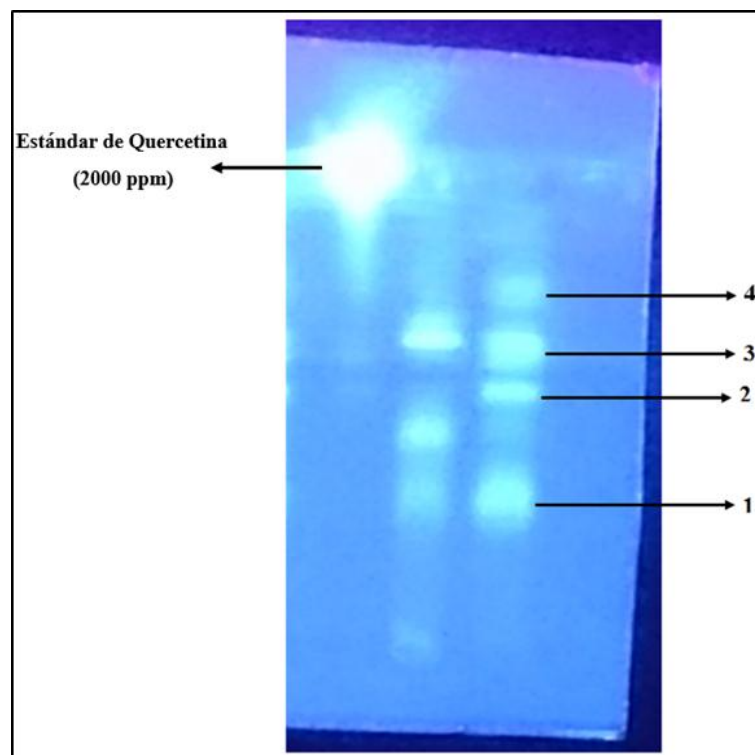


Figura 1-3. TLC del extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora*
Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Muestra: Extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* a 2000 ppm

Fase estacionaria: Silica gel 60 F254

Fase móvil: Acetato de etilo: Ácido acético: Acido fórmico: Agua (10: 1.1: 1.1: 2.6) mL

Revelador: Cloruro de Aluminio al 1% en metanol

Potenciador de fluorescencia: PEG 400 al 5% en metanol.

La cromatografía en capa fina permitió separar e identificar los posibles compuestos químicos que se encuentran presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* mediante la comparación de los valores de Rf con datos bibliográficos. La lámpara UV largo (365 nm) reveló la presencia de 4 manchas de color verde en la placa cromatográfica (Figura 1-3); la primera mancha cuyo Rf fue de 0.32 pudo tratarse de quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido o kaempferol-3-O-gentiobiosido debido a que son los dos compuestos con valores de Rf más cercanos, la segunda mancha que presentó un Rf de 0.55 fue interpretada como quercetina-3-O-glucorónido, la tercera mancha con un Rf de 0.62 fue relacionada con vitexina y la cuarta mancha con un Rf de 0.72 pudo haber sido isoramnetina-3-O-glucósido que según bibliografía tiene un Rf de 0.75 (Tabla 3-3). (Wagner et al., 2001b, pp.210-211) Estos metabolitos pueden ser los responsables directos de la actividad fotoprotectora por sus propiedades antioxidantes ideales. (Gilaberte y González, 2010e, pp.664-665)

Tabla 3-3. Posibles compuestos identificados en hojas de *Oreocallis grandiflora* por TLC

<i>Oreocallis grandiflora</i>		Referencia bibliográfica (Wagner, 2001)	
Compuesto	Rf	Posibles compuestos identificados	Rf
1	0.32	quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido	0.34
		kaempferol-3-O-gentiobiosido	0.30
2	0.55	quercetina-3-O-glucorónido	0.55
3	0.62	apigenina-8-C-glucósido (vitexina)	0.62
4	0.75	isoramnetina-3-O-glucósido	0.72

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Todos los compuestos tienen un valor de Rf característico en las condiciones cromatográficas específicas (adsorbente, sistema de solventes, tamaño de la cubeta, temperatura) (UNAM, 2007d); en este sentido existe la posibilidad de que no se traten específicamente de estos compuestos debido a posibles variaciones en las condiciones que se realizó el estudio que afectan directamente a la eficacia, eficiencia y resolución de la placa cromatográfica.

En el estudio realizado por (Guerrero, 2014, pp.38-39), se identificó la presencia de flavonoides glicosilados, quercetina e hidroxiflavona luego de realizar la cromatografía en capa fina del

extracto hidroalcohólico de *Oreocallis grandiflora* con otro sistema de solventes, de manera general estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación.

3.5 Control de calidad del estándar McFarland

Tabla 4-3. Absorbancia de los estándares McFarland

No Estándar McFarland	Absorbancia (625 nm)
1	0.171
2	0.380
3	0.579
4	0.774
x (0.5)	0.091

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

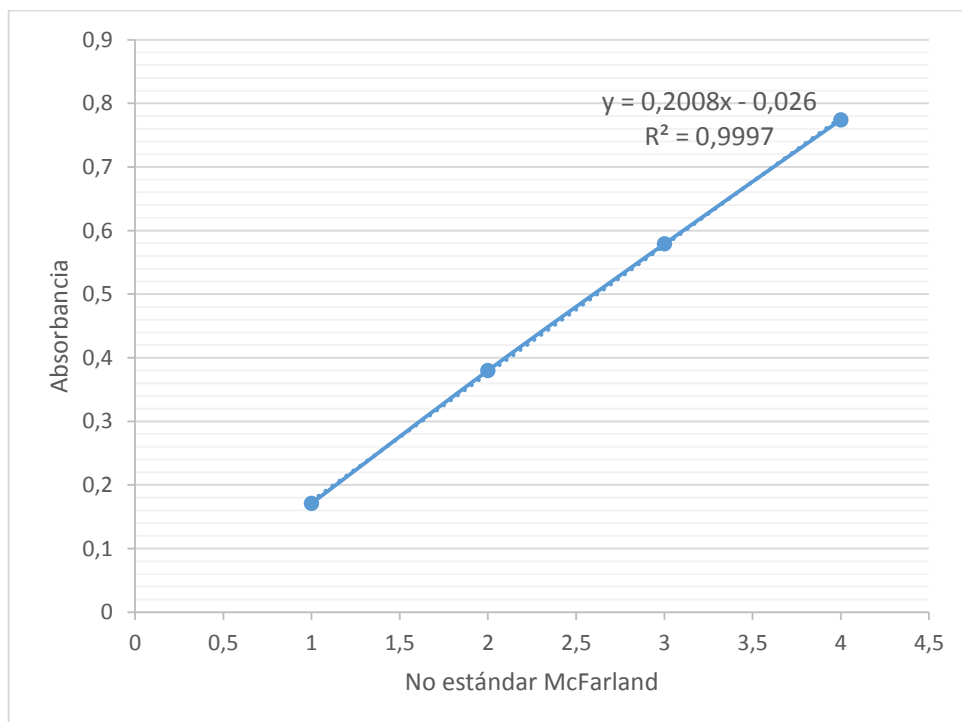


Gráfico 1-3. Curva de calibración del estándar McFarland

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

$$Y = A + BX$$

Y = Absorbancia

X = No de Estándar McFarland

La absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 625 nm fue 0.091; este valor se encuentra dentro del rango establecido (0.08 – 0.1) para el estándar McFarland No 0.5. (Prolab Diagnostics, 2015b) Al reemplazar esta absorbancia en la ecuación de la recta se obtuvo un valor de 0.58; lo que significa que la muestra efectivamente corresponde al estándar McFarland No 0.5.

Mediante el control de calidad se comprobó que la turbidez del Estándar McFarland No 0.5 corresponde a una suspensión bacteriana de concentración 1.5×10^8 UFC/mL aproximadamente; gracias a esto se logró estandarizar la concentración de cada una de las suspensiones bacterianas utilizadas en el ensayo de actividad fotoprotectora con el propósito de garantizar resultados reales y confiables.

3.6 Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida

Tabla 5-3. Efecto fotoprotector del extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora*

TIEMPO (min)	2000 ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	20 ppm UFC/mL	BLANCO UFC/MI
0	117333333 (±18036999)	128000000 (±28000000)	132000000 (±31749016)	118666667 (±14047538)
30	156666667 (±3214550)	5333333 (±1527525)	2333333 (±577350)	0
60	1200 (±400)	267 (±306)	0	0
90	333 (±115)	0	0	0
120	133 (±115)	0	0	0
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

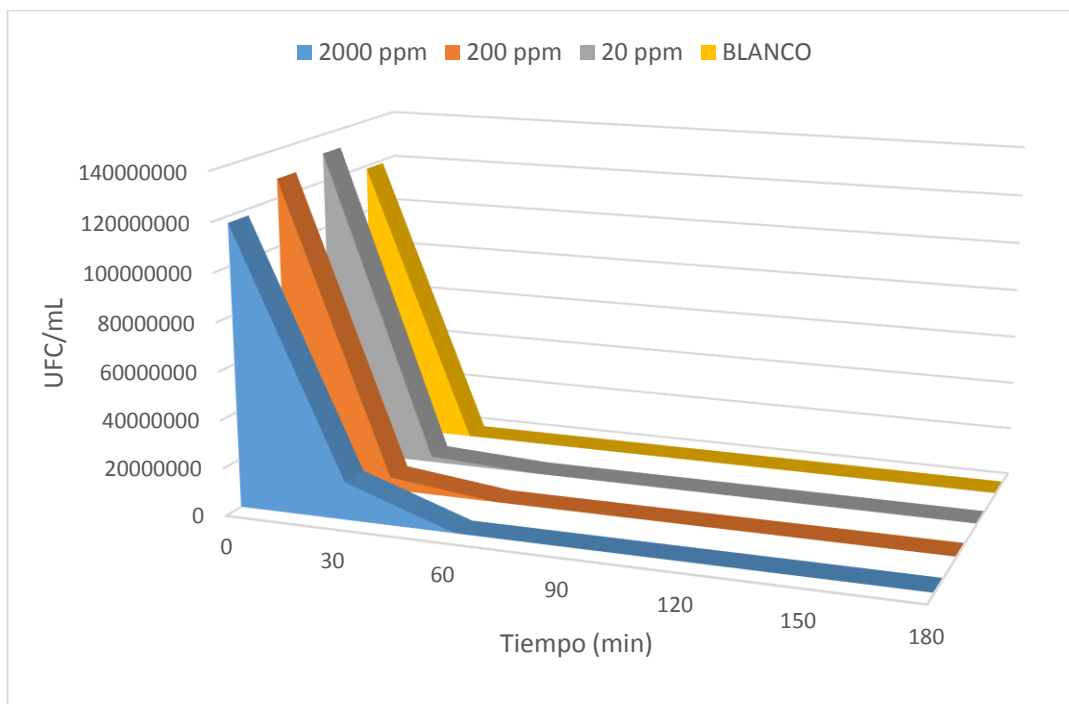


Gráfico 2-3. Efecto fotoprotector del extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora*
Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Tabla 6-3. Efecto fotoprotector del control positivo pamidato-o

TIEMPO (min)	2000 ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	20 ppm UFC/mL	BLANCO UFC/mL
0	128000000 (±22271057)	118666667 (±38436094)	130666667 (±34486712)	118666667 (±14047538)
30	12333333 (±1527525)	3666667 (±1527525)	1666667 (±1527525)	0
60	600 (±346)	267 (±306)	0	0
90	133 (±231)	0	0	0
120	0	0	0	0
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

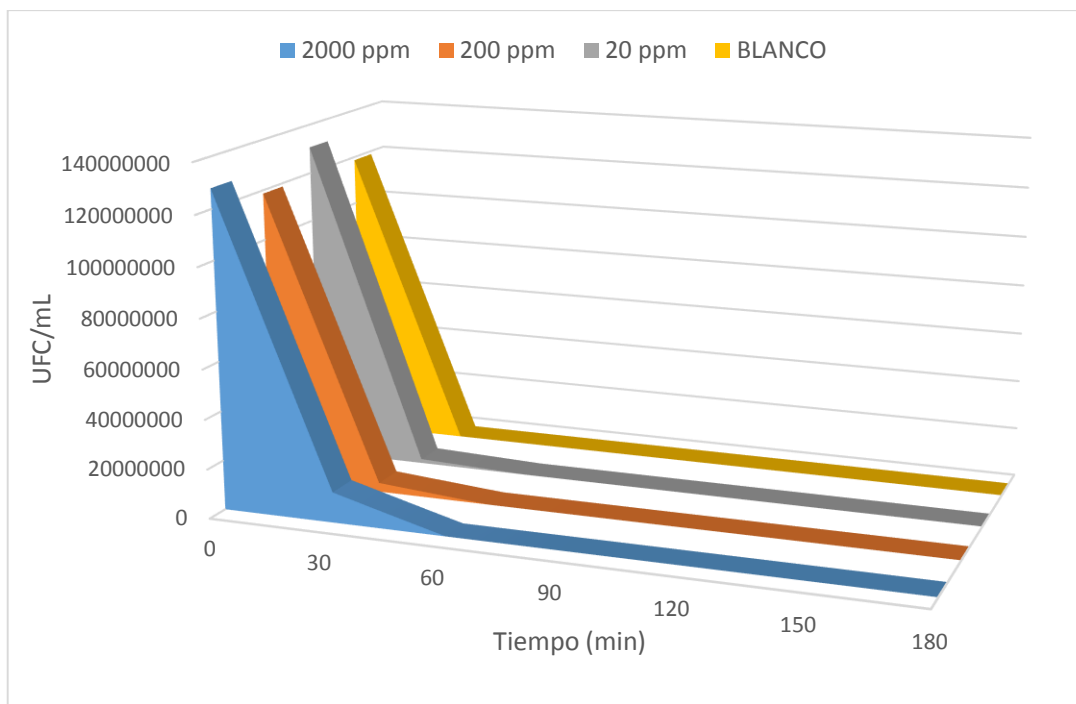


Gráfico 3-3. Efecto fotoprotector del control positivo pamidato-o

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Tabla 7-3. Efecto fotoprotector del control positivo Octilmetoxicinamato (OMC)

TIEMPO (min)	2000 ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	20 ppm UFC/mL	BLANCO UFC/mL
0	158666667 (±34486712)	148000000 (±28000000)	138666667 (±34019602)	118666667 (±14047538)
30	13666667 (±2516611)	4666667 (±2081666)	1666667 (±1527525)	0
60	1133 (±611)	333 (±231)	0	0
90	467 (±306)	0	0	0
120	0	0	0	0
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

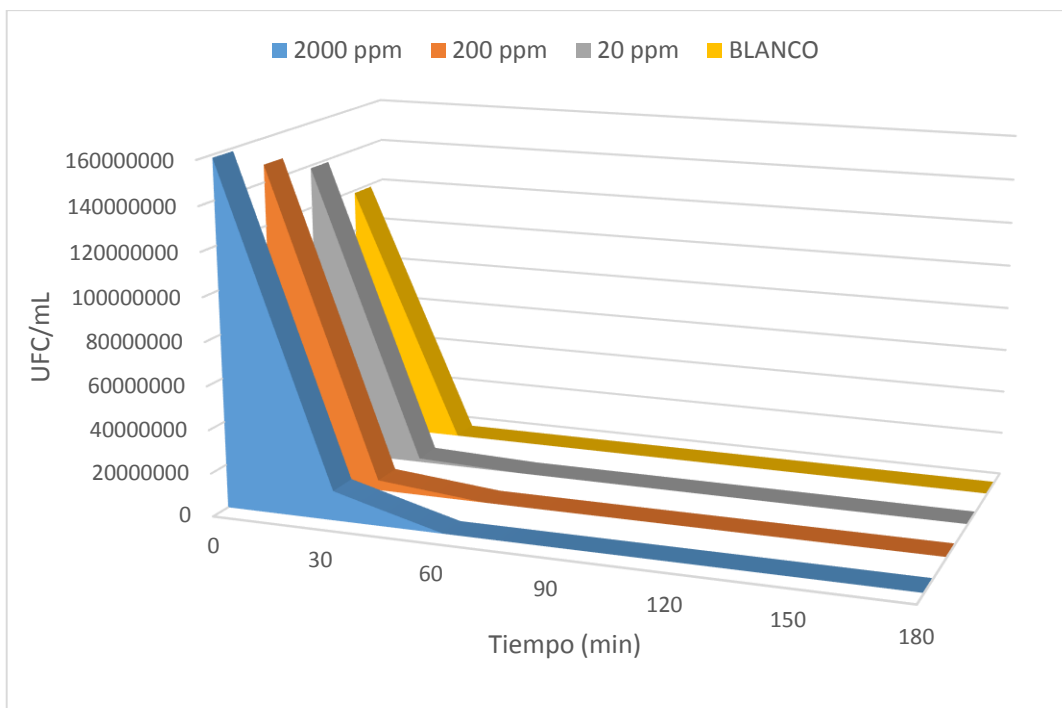


Gráfico 4-3. Efecto fotoprotector del control positivo Octilmetoxicinamato (OMC)
Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Tabla 8-3. Porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* frente a radiación UVB

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	% DE SUPERVIVENCIA DE <i>Escherichia coli</i>		
	2000 ppm	200 ppm	20 ppm
Extracto etanólico (<i>Oreocallis grandiflora</i>)	13,30 ($\pm 1,33$)	4,22 ($\pm 1,15$)	1,85 ($\pm 0,65$)
Pamidato (PAD)	9,71 ($\pm 0,77$)	3,03 ($\pm 0,60$)	1,26 ($\pm 1,10$)
Octilmetoxicinamato (OMC)	8,66 ($\pm 0,53$)	3,11 ($\pm 1,10$)	1,06 ($\pm 0,93$)

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

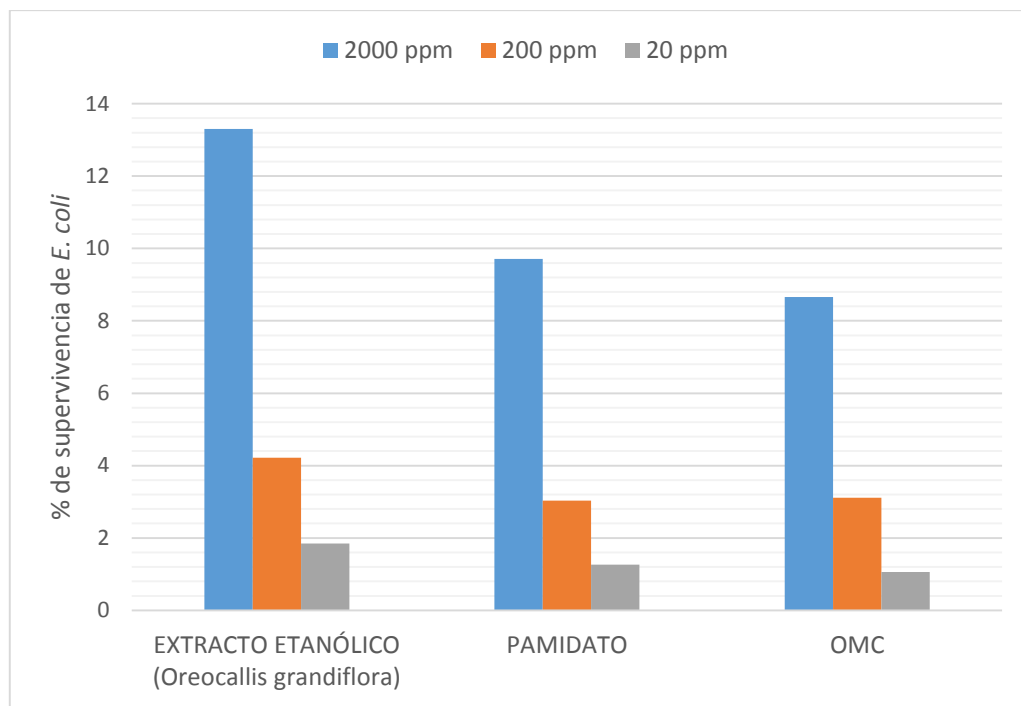


Gráfico 5-3. Porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* frente a radiación UVB
Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Los datos del número de unidades formadoras de colonias (UFC) sobrevivientes para cada control positivo y subextracto etanólico con diferente concentración fueron transformados en términos de porcentaje (%) de supervivencia de *Escherichia coli*; dicho porcentaje tiene relación directa con la capacidad fotoprotectora que poseen las sustancias analizadas; de tal modo que un elevado porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* supone una mayor actividad fotoprotectora y viceversa. La capacidad de las sustancias fotoprotectoras para bloquear y neutralizar la radiación UVB determinó el tiempo que las bacterias UFC lograron sobrevivir en cada caso.

El análisis estadístico se realizó con los datos de porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* proporcionados por los controles positivos a 20 ppm y subextractos etanólicos a 2000, 200 y 20 ppm. Estos datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza al presentar valores P mayores que el nivel de significancia α ($P > 0.05$) luego de realizar los test correspondientes.

El análisis de varianza de un factor (test Anova) indicó un valor P menor que el nivel de significancia α ($P < 0.05$), lo que significa que al menos uno de los subextractos etanólicos proporciona un porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* significativamente diferente a los demás subextractos y controles positivos a 20 ppm.

Todos los subextractos etanólicos al igual que los controles positivos con diferente concentración presentaron actividad fotoprotectora; mientras que el blanco (etanol al 70%) no brindó protección.

alguna frente a radiación UVB motivo por el cual su porcentaje de supervivencia de *E. coli* fue nulo en esta determinación.

En este ensayo se pudo verificar que el porcentaje de supervivencia de *E. coli* depende directamente de la concentración que presenta la sustancia fotoprotectora; es así que los subextractos y controles positivos de mayor concentración brindaron mayor efecto fotoprotector por más tiempo que los de menor concentración.

La actividad fotoprotectora representada en porcentaje de supervivencia de *E. coli* que poseen los subextractos etanólicos de hojas de *Oreocallis grandiflora* con diferente concentración se comparó con la actividad que proporciona cada uno de los controles positivos a 20 ppm mediante el método estadístico de Dunnet.

Los controles positivos tanto Octilmetoxicinamato como Pamidato y el subextracto etanólico, todos a 20 ppm de concentración, presentaron un porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* promedio de 1.06%, 1.26 % y 1.84% respectivamente, lo que quiere decir que a esta concentración ambos controles positivos y el subextracto etanólico ofrecen casi el mismo efecto fotoprotector frente a radiación UVB (no hay diferencia significativa). En todos los casos las bacterias sometidas a este tipo de radiación lograron sobrevivir solamente los primeros 30 minutos del ensayo, lo que se traduce en una actividad fotoprotectora relativamente baja.

El porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* promedio del subextracto etanólico a 200 ppm fue de 4.22%, razón por la cual este brinda mayor efecto fotoprotector que todas las sustancias analizadas a 20 ppm de concentración (existe diferencia significativa entre concentraciones). Las bacterias protegidas con este subextracto lograron sobrevivir a la radiación UVB durante los primeros 60 minutos del ensayo.

El subextracto etanólico a 2000 ppm con un porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* promedio de 13.30% presentó mejor efecto fotoprotector *in vitro* que el resto de subextractos y controles positivos, gracias a esto las bacterias sometidas a radiación UVB lograron sobrevivir un tiempo máximo de 120 min.

La concentración de cada subextracto es el factor que determina si existe o no diferencia significativa con el porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* que proporcionan los controles positivos a 20 ppm. El efecto fotoprotector del subextracto etanólico a 2000 ppm fue 3 veces mayor que el subextracto a 200 ppm y por lo menos 7 veces mayor con respecto al subextracto y controles positivos a 20 ppm. En el Gráfico 6-3 se puede verificar la capacidad fotoprotectora de cada subextracto y control positivo mediante la disminución de unidades formadoras de colonias en función al tiempo de exposición a radiación UVB.

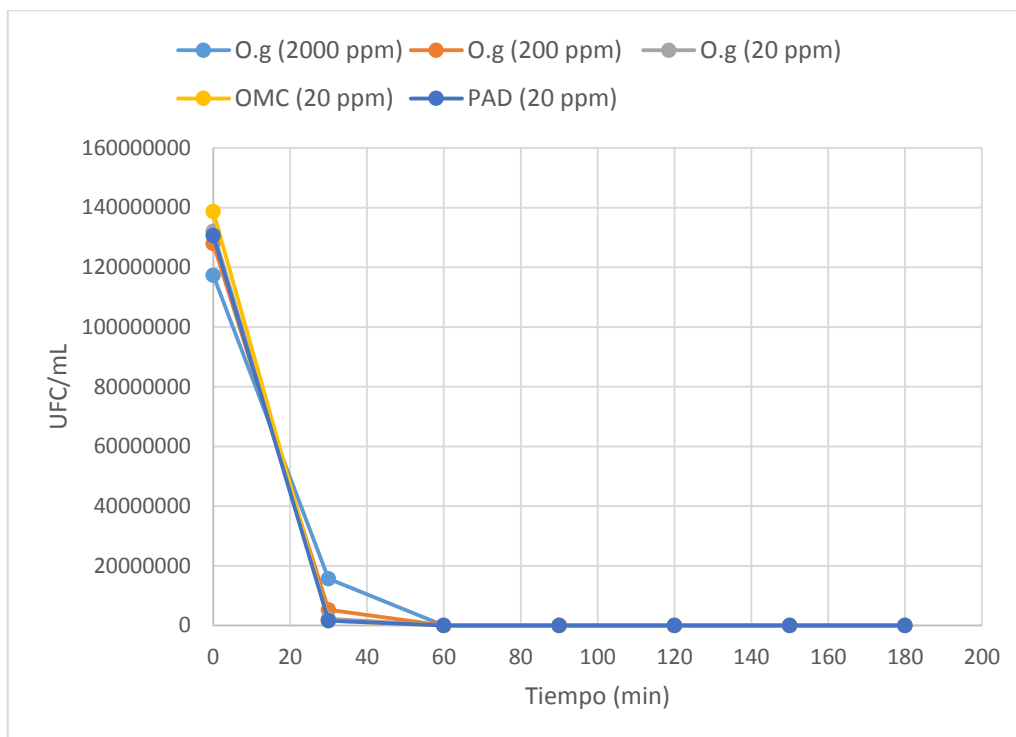


Gráfico 6-3. UFC sobrevivientes vs tiempo de exposición a radiación UVB

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Mediante este ensayo se pudo confirmar que los compuestos presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* efectivamente poseen actividad fotoprotectora *in vitro*, varios de estos compuestos son flavonoides, filtros solares naturales que pueden ser incorporados en nuevos productos de protección solar más efectivos, seguros y accesibles para la población en general; e incluso más amigables con el medio ambiente que los protectores solares convencionales usados masivamente en la actualidad. (Gilaberte y González, 2010f, p.664)

3.7 Factor de protección solar (FPS) *in vitro*

Se determinó el factor de protección solar (FPS) *in vitro* del extracto etanólico y de los controles positivos, todos a la concentración de 10 ppm, reemplazando las absorbancias obtenidas en la ecuación de Mansur. La suma de todos los valores parciales correspondientes a cada longitud de onda (λ) es el FPS total que brinda cada sustancia analizada frente a radiación UVB.

El ensayo originalmente debió realizarse con las sustancias fotoprotectoras a 20 ppm, es decir a la misma concentración mínima utilizada en el ensayo de fotoproteccion, pero esto no fue factible debido a que los valores de absorbancia emitidos por el espectrofotómetro eran constantes (erróneos) en todas las longitudes de onda en las que se realizó la medición; motivo por el cual se tuvo que reducir la concentración de las sustancias fotoprotectoras a 10 ppm.

Tabla 9-3. Resultados del factor de protección solar (FPS) *in vitro*

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA (10 ppm)	FPS <i>in vitro</i>
Extracto etanólico (hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>)	13.56 (± 0.21)
Pamidato-O (PAD)	6.21 (± 0.15)
Octilmetoxicinamato (OMC)	11.82 (± 0.11)

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

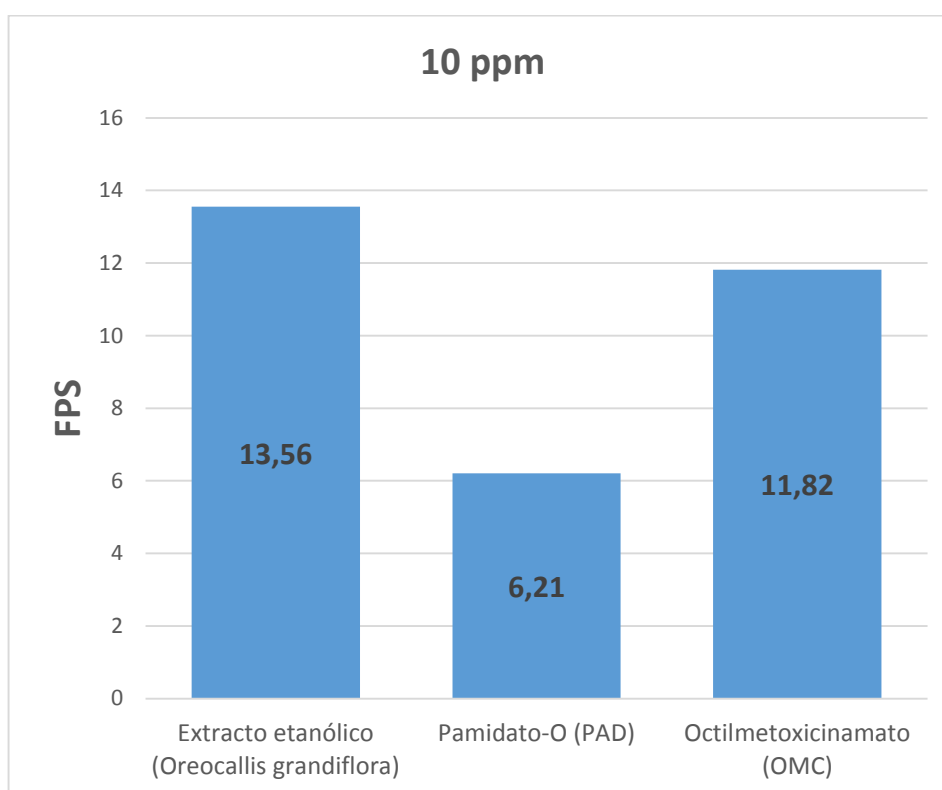


Gráfico 7-3. Comparación de resultados del factor de protección solar (FPS) *in vitro*

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

El extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* con un valor promedio de 13.56 brinda mayor FPS *in vitro* que los controles positivos con la misma concentración (10 ppm) cuyos valores promedio de FPS para el Pamidato-O y Octilmetoxicinamato fueron 6.21 y 11.82 respectivamente. Los valores de FPS *in vitro* correspondientes a los controles positivos obtenidos en este ensayo son muy cercanos a los encontrados en bibliografía donde se indica un FPS de 5.48 y 12.09 para el Pamidato-O y Octilmetoxicinamato respectivamente. (El-Boury et al., 2007a, pp.2-3)

El FPS *in vitro* del extracto etanólico efectivamente coincide con los resultados obtenidos en el ensayo de fotoprotección en donde este mismo extracto proporciona un porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli* superior por más tiempo que los controles positivos; de esta manera se confirma que los compuestos presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* (presumiblemente flavonoides) poseen un importante efecto fotoprotector al actuar como filtros solares naturales capaces de bloquear, absorber y neutralizar la radiación UVB.

Según la clasificación COLIPA el extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* a 10 ppm proporciona un FPS “alto” que es relativamente mejor al FPS “medio” que brindan los controles positivos a la misma concentración; es decir que la capacidad fotoprotectora de los compuestos presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* supera a los filtros químicos UVB presentes en productos de protección solar de uso convencional.

Al comparar el FPS *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* con estudios similares de otras especies vegetales se confirma claramente que con menor concentración (10 ppm) este extracto brinda mayor FPS con respecto al resultado obtenido en el estudio *in vitro* de las actividades antioxidantes y fotoprotectoras de los extractos secos de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) por citar un ejemplo. (Gonçalves et al., 2013e, 124-125)

3.8 Contenido de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales se realizó mediante un método espectrofotométrico con cloruro de aluminio ($AlCl_3$); para lo cual se tomó como referencia la ecuación de la recta $A = 0.001 C + 0.0015$ ($R^2 = 0.9948$) que corresponde a la curva de calibración del estándar de quercetina realizada anteriormente por (Chávez, 2016b) en un estudio similar con soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm respectivamente.

Es importante indicar que en nuestro caso no fue necesario realizar diluciones del extracto etanólico con metanol como se indica originalmente en la técnica desarrollada por (Wu y Ng, 2008c, p.325). El ensayo se efectuó de forma directa utilizando una alícuota (50 μ L) de extracto etanólico a 2000 ppm con el propósito de que la absorbancia obtenida se encuentre dentro del intervalo de la curva de calibración del estándar de quercetina.

Los calculados se realizaron reemplazando el valor de la absorbancia en la ecuación de la recta dando como resultado una concentración de 60.5 ppm a partir de la cual se obtuvo el contenido de flavonoides totales expresado en mgEQ/g de extracto seco y en % EQFT (gEQ/100 g de extracto seco).

Tabla 10-3. Contenido de flavonoides totales en hojas de *Oreocallis grandiflora*

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	FLAVONOIDES TOTALES	
	mg Equivalentes de Quercetina / g de extracto seco	g Equivalentes de Quercetina / 100 g de extracto seco (% EQFT)
Extracto etanólico (hojas de <i>Oreocallis grandiflora</i>)	535.68 (\pm 13.23)	53.57 (\pm 2.47)

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

El contenido de flavonoides totales promedio presente en el extracto etanólico al 70% de hojas de *Oreocallis grandiflora* fue de 535.68 mgEQ/g de extracto seco; lo que en términos de porcentaje significa que existen 53.57 gEQ/100g de extracto seco de hojas de *Oreocallis grandiflora*. Estos resultados indican que la droga vegetal en estudio posee una gran cantidad de flavonoides, los mismos que son utilizados como mecanismo de defensa frente a las grandes dosis de radiación UVB que recibe constantemente este vegetal al vivir a una altura promedio de 3500 m.s.n.m.

La gran cantidad de flavonoides que poseen las hojas de *Oreocallis grandiflora* corroboran los resultados prometedores obtenidos tanto en el ensayo de fotoprotección como en la determinación del FPS *in vitro* donde estos compuestos naturales al actuar como filtros solares bloquearon y neutralizaron la radiación UVB con mayor eficacia que los filtros solares químicos convencionales.

El contenido de flavonoides totales presente en hojas de *Oreocallis grandiflora* es considerablemente superior en comparación con los resultados obtenidos en estudios similares de otras especies vegetales como en el estudio de la actividad fotoprotectora *in vitro* del extracto bruto de cáscara de *Spondias purpurea L* cuyo extracto etanólico presentó 2.64 mgEQ/g; por citar uno de los tantos ejemplos que existen. (Silva et al., 2016b, p.511)

Otros estudios realizados a diferentes especies del género Passiflora en cambio revelan que los solventes de mayor polaridad como etanol y metanol extraen mayor cantidad de flavonoides con respecto a otros solventes de menor polaridad, razón por la cual el extracto etanólico al 70% de hojas de *Oreocallis grandiflora* presentó un contenido considerablemente alto de este tipo de metabolitos. De igual manera que en los estudios anteriores el contenido de flavonoides totales presentes en hojas y flores de varias especies Passifloras es significativamente inferior que las cantidades encontradas en *Oreocallis grandiflora*. (Cabrera et al., 2014, pp.206-207)

3.9 Barrido espectral UV

El barrido espectrofotométrico se realizó a una longitud de onda de 200 a 400 nm. Todos los extractos y controles positivos a 100 ppm de concentración presentaron espectros con máximos de absorción (picos) mejor definidos que las soluciones a 1000 y 10 ppm.

En la Gráfico 8-3 se indican los espectros de cada extracto con sus respectivos máximos de absorción (picos) en una longitud de onda entre 290 y 320 nm correspondientes a los compuestos responsables del efecto fotoprotector frente a radiación UVB.

El extracto etanólico con 7 máximos de absorción (picos) en su espectro de barrido contiene mayor número de compuestos fotoprotectores que los extractos preparados con agua y cloroformo cuyos espectros presentaron 5 y 2 picos respectivamente; de esta manera se confirma que los solventes polares como etanol, metanol así como también las mezclas hidroalcohólicas en diferentes proporciones extraen la gran mayoría de flavonoides presentes en especies vegetales. (Pérez et al., 2013, p.20)

Los diferentes extractos en sus espectros de barrido presentan máximos de absorción (picos) en longitudes de onda que son características para ciertos tipos de flavonoides; en base a esto se puede decir que los compuestos presentes en las hojas de *Oreocallis grandiflora* con actividad fotoprotectora contra radiación UVB probablemente son de tipo flavonas, isoflavonas y dihidroflavonoles como se indica en la Tabla 11-3.

Los espectros de los controles positivos a 100 ppm con diferentes solventes confirman el efecto fotoprotector que estos brindan frente a radiación UVB ya que en todos los casos sus máximos de absorción (picos) se encuentran dentro del rango de longitud de onda entre 290 y 320 nm. Gráfico 9-3. Según datos bibliográficos el Pamidato-o y Octilmetoxicinamato presentan sus máximos de absorción a una longitud de onda de 290 nm y 310 nm respectivamente. (El-Boury et al., 2007b, p.2) Todo esto comprueba que los subextractos etanólicos de hojas de *Oreocallis grandiflora* efectivamente poseen mejor actividad fotoprotectora *in vitro* en relación a los controles positivos usados en esta investigación.

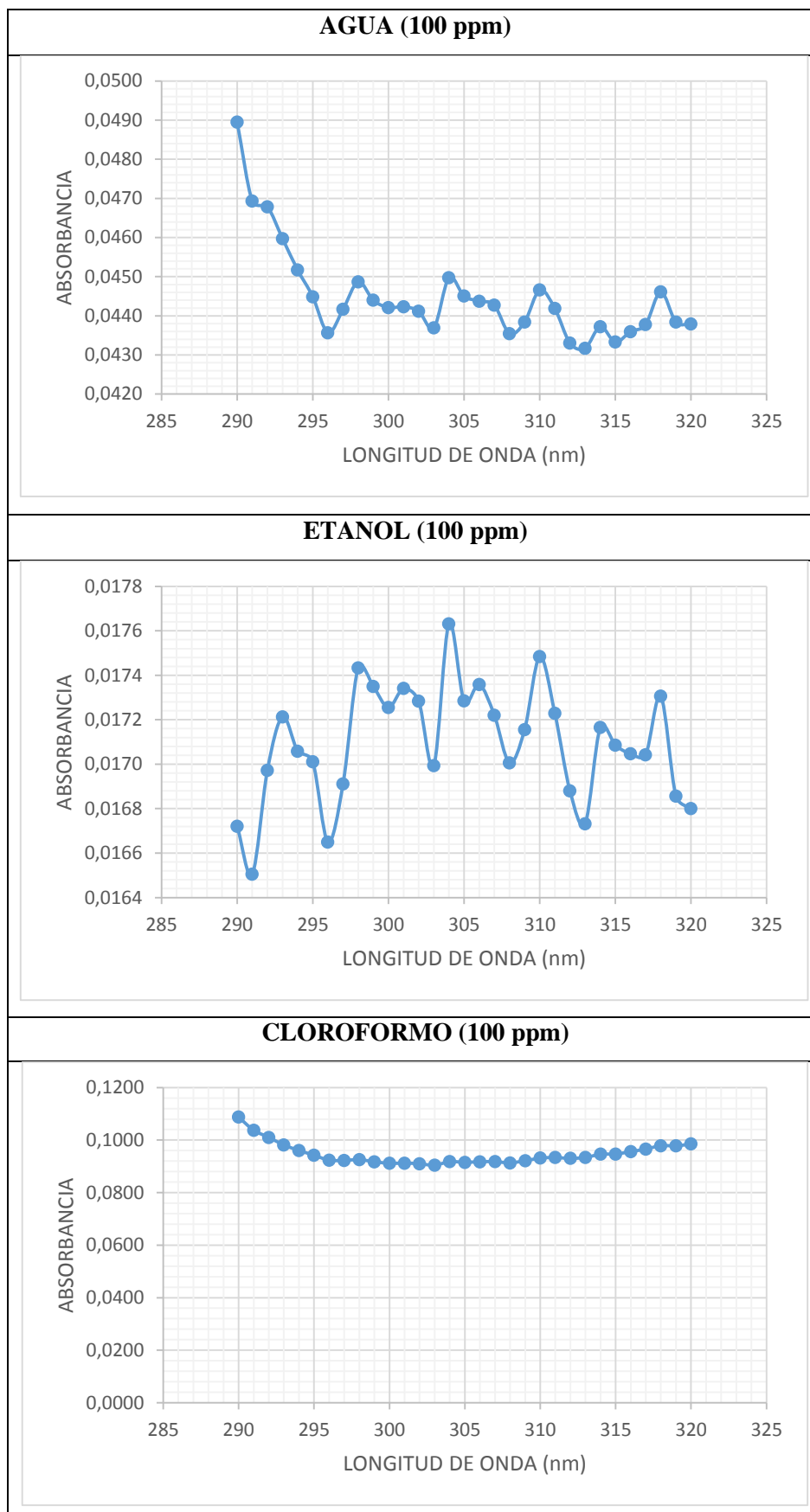


Gráfico 8-3. Espectros de absorción de los extractos de hojas de *Oreocallis grandiflora*
 Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

Tabla 11-3. Posibles compuestos responsables del efecto fotoprotector por barrido UV

Extractos <i>Oreocallis grandiflora</i> (100 ppm)	UV PRÁCTICO	ABSORBANCIA	UV TEÓRICO	POSIBLES COMPUESTOS
AGUA	298	0.0449		
	304	0.0450	300 – 330	Dihidroflavonoles
	310	0.0447	300 – 330	Dihidroflavonoles
	314	0.0437	300 – 330	Dihidroflavonoles
	318	0.0446	300 – 330	Dihidroflavonoles
ETANOL	293	0.0172	275 – 295	Isoflavonas
	298	0.0174		
	304	0.0176	300 – 330	Dihidroflavonoles
	306	0.0174	300 – 330	Dihidroflavonoles
	310	0.0175	300 – 330	Dihidroflavonoles
	314	0.0172	310 – 350	Flavonas
	318	0.0173	300 – 330	Flavonas
CLOROFORMO	298	0.0925		
	314	0.0979	300 – 330	Flavonas

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

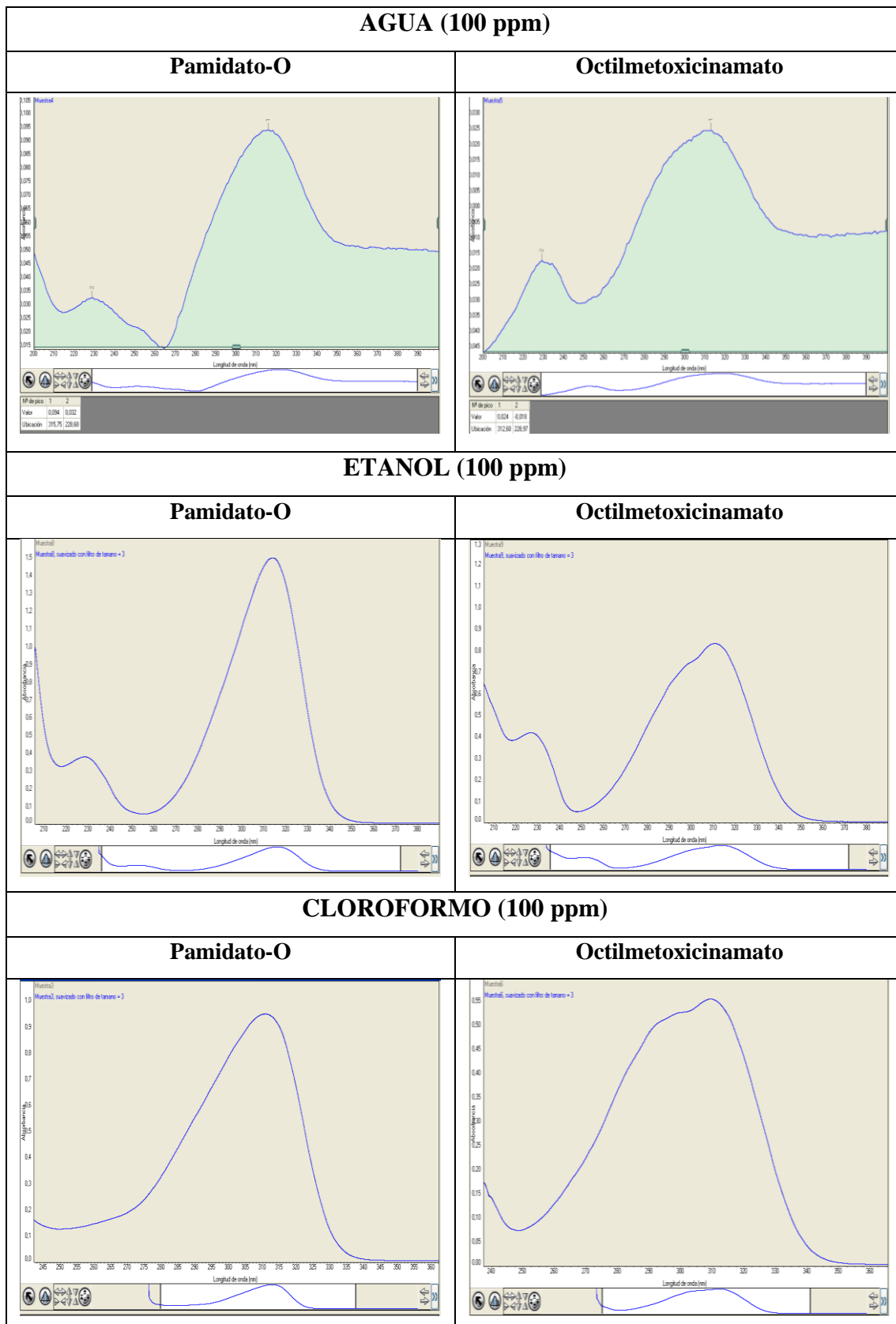


Gráfico 9-3. Espectros de absorción de los controles positivos

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

CONCLUSIONES

1. Los subextractos etanólicos de hojas de *Oreocallis grandiflora* presentaron actividad fotoprotectora *in vitro* frente a radiación UVB, la capacidad fotoprotectora que posee cada uno de estos depende directamente de su concentración; con mayor porcentaje de supervivencia de bacterias *Escherichia coli*, el subextracto etanólico a 2000 ppm concede mejor fotoprotección que el resto de subextractos y controles positivos de menor concentración.
2. Mediante el tamizaje fitoquímico en las hojas de *Oreocallis grandiflora* se identificó de forma cualitativa la presencia de compuestos fenólicos, en especial flavonoides y antocianidinas, presuntos responsables de la actividad fotoprotectora frente a radiación UVB; de igual manera se encontraron otros tipos de metabolitos tales como triterpenos, esteroides, saponinas, catequinas, quinonas, lactonas, coumarinas, aceites y azúcares reductores. La cromatografía en capa fina por su parte reveló la posible presencia de ciertos flavonoides con supuesto efecto fotoprotector como quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido, quercetina-3-O-glucorónido, kaempferol-3-O-gentiobiósido, apigenina-8-C-glucósido (vitexina) e isoramnetina-3-O-glucósido.
3. Se determinó el factor de protección solar (FPS) *in vitro* tanto para el subextracto etanólico como para los controles positivos pamidato-o y octilmetoxcinamato, todos a la concentración de 10 ppm; siendo el subextracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* el que brindó mayor FPS *in vitro* en comparación a ambos controles positivos con igual concentración; lo que concuerda y corrobora los resultados obtenidos en el ensayo de actividad fotoprotectora. De igual manera se puede decir que el FPS *in vitro* es proporcional a la concentración de los subextractos.
4. Mediante el método espectrofotométrico con cloruro de aluminio (AlCl₃) se cuantificó que el contenido de flavonoides totales presente en el extracto etanólico de hojas de *Oreocallis grandiflora* fue de 535.68 mg de equivalentes de quercetina por cada gramo de extracto seco; lo que en términos de porcentaje equivale a 53.57% (53.57 gEQ/100g). Esta elevada cantidad de flavonoides sugiere que el subextracto etanólico contiene varios compuestos que al actuar en forma individual o combinados son responsables de la actividad fotoprotectora frente a radiación UVB.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda buscar un método que permita determinar el factor de protección solar (FPS) *in vitro* de extractos vegetales con mayor concentración.
- Se recomienda continuar con la investigación de *Oreocallis grandiflora* para identificar, aislar y elucidar estructuralmente los metabolitos responsables de la actividad fotoprotectora y posteriormente incluirlos como filtros solares naturales en nuevos productos de protección solar más efectivos, seguros y accesibles para la población en general.
- Se deben profundizar los estudios de esta especie vegetal con el propósito de determinar nuevas propiedades farmacológicas por ser una fuente potencial de gran cantidad y variedad de flavonoides.

BIBLIOGRAFÍA

AGATI, G. et al. “Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past”. *Plant Physiology and Biochemistry* [en línea], 2013, 72, pp.35–45. [Consulta: 10 de octubre de 2016]. ISSN 1873-2690. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>

AGENCIA ESPACIAL CIVIL ECUATORIANA. *exa.ec* [blog]. 2008. [Consulta: 10 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.exa.ec>

ALEJANDRO, M. Aislamiento biodirigido (*in vitro*) de sustancias antioxidantes y antihiper glucemiantes a partir de *Oreocallis grandiflora* (cucharilla) [en línea] (Tesis). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador. 2010. pp.19-21 [Consulta: 17 de octubre de 2016]. Disponible en: http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1858/3/UTPL_Alejandro_Espinosa_Mónica_Haidee_1001575.pdf

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Radiación ultravioleta* [blog]. 2015. [Consulta: 12 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.cancer.org>

AVILA, J. et al. “Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*”. *Fitoterapia* [en línea], 2005, 76(3–4), pp.301–309. [Consulta: 11 de octubre de 2016]. ISSN 0367-326X. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.009>

ATCC. *Who we are.* [blog]. 2015. [Consulta: 11 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.atcc.org>

BOHÓRQUEZ, J.; PÉREZ, J. “Radiación ultravioleta”. *Assur Piscinas* [en línea], 2009, 9, pp.97–104. [Consulta: 11 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.assurpiscinas.com/drpiscina.php?id=12>

BURNETT, M. et al. “Sunscreens: Obtaining adequate photoprotection”. *Dermatologic Therapy* [en línea], 2012, 25(3), pp.244–251. [Consulta: 11 de octubre de 2016]. ISSN 1396-0296. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01503.x>

CABRERA, S. et al. “Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos e hidroalcohólicos de granadilla (*Passiflora ligularis*)”. *Acta Agronómica* [en línea], 2014, 63(3), pp.204-211. [Consulta: 11 de octubre de 2016]. ISSN 0120-2812. Disponible en: <http://doi.org/10.15446/acag.v63n3.41976>

CABRERA, C.; LÓPEZ, M. “Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel”. *Oncología* [en línea], 2006, (Barcelona), 29(7), pp.25–32. [Consulta: 15 de octubre de 2016]. ISSN 0378-4835. Disponible en: <http://doi.org/10.4321/S0378-48352006000700003>

CARRASCO, L. “Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas”. *Idesia* [en línea], 2009, (Arica), 27(3), pp.59–76. [Consulta: 15 de octubre de 2016]. ISSN 0718-3429. Disponible en: <http://doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>

CARRASCOSA, J.; RODRÍGUEZ, C. “Efectos adversos de la fototerapia: clínica y manejo”. *Terapéutica Dermatológica* [en línea], 2008, 23(8), pp.447–452. [Consulta: 14 de octubre de 2016]. ISSN 0213-9251. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0213-9251\(08\)74942-6](http://doi.org/10.1016/S0213-9251(08)74942-6)

CHÁVEZ, B. Evaluación de las actividades antiinflamatorias “*in vivo*” y antioxidante, de tinturas elaboradas a base de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y sangre de drago (*Croton lechieri*). [en línea] (Tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2016. pp.49-50. [Consulta: 19 de octubre de 2016].

COLEGIO DE FARMACEUTICOS DE BARCELONA. [blog]. 2016. [Consulta: 11 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.farmaceuticonline.com>

DE GRUIJL, F. “Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation”. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* [en línea], 2002, 15(5), pp.316–320. [Consulta: 12 de octubre de 2016]. ISSN 1422-2868. Disponible en: <http://doi.org/10.1159/000064535>

DEBUYS, H. et al. “Modern approaches to photoprotection”. *Dermatologic clinics* [en línea], 2000, 18(4), pp.577-590. [Consulta: 12 de octubre de 2016]. ISSN 0733-8635. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8635\(05\)70208-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8635(05)70208-4)

DIFFEY, B. “Sunscreen isn’t enough”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2001, 64(2–3), pp.105–108. [Consulta: 13 de octubre de 2016]. ISSN 1011-1344. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00195-6](http://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00195-6)

DINKOVA, A. “Phytochemicals as protectors against ultraviolet radiation: Versatility of effects and mechanisms”. *Planta Medica* [en línea], 2008, 74(13), pp.1548–1559. [Consulta: 18 de octubre de 2016]. ISSN 0032-0943. Disponible en: <http://doi.org/10.1055/s-2008-1081296>

DURO, E. et al. “El sol y los filtros solares”. *Medifam* [en línea], 2003, 13(3), pp.159–165. [Consulta: 16 de octubre de 2016]. ISSN 1131-5768. Disponible en: <http://doi.org/10.4321/S1131-57682003000300005>

EL-BOURY, S. et al. “Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by *in vitro* method”. *International Journal of Pharmaceutics* [en línea], 2007, 340(1–2), pp.1–5. [Consulta: 17 de octubre de 2016]. ISSN 0378-5173. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.047>

ESPINOSA, M. et al. “Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador”. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas* [en línea], 2013, 12(1), pp.59–68. [Consulta: 10 de octubre de 2016]. ISSN 0717-7917. Disponible en: http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/008_articulo_7_7.pdf

FAO. *Escherichia coli*. [blog]. 2011. [Consulta: 17 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf>

FERREIRA, T. et al. “Photoprotection et maladies cutanées”. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie* [en línea], 2012, 139, pp. S83–S91. [Consulta: 17 de octubre de 2016]. ISSN 0151-9638. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0151-9638\(12\)70116-3](http://doi.org/10.1016/S0151-9638(12)70116-3)

GASPARRO, F. “Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: The need for UVA protection and evaluation of efficacy”. *Environmental Health Perspectives* [en línea], 2000, 108(1), pp.71–78. [Consulta: 22 de octubre de 2016]. ISSN 0091-6765. Disponible en: <http://doi.org/10.1289/ehp.00108s171>

GILABERTE, Y. et al. “Fotoprotección”. *Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2003, 94(5), pp.271–293. [Consulta: 22 de octubre de 2016]. ISSN 0001-7310. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0001-7310\(03\)76688-5](http://doi.org/10.1016/S0001-7310(03)76688-5)

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. “Novedades en fotoprotección”. *Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2010, 101(8), pp.659–672. [Consulta: 22 de octubre de 2016]. ISSN 0001-7310. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.ad.2010.04.003>

GONÇALVES, R. et al. “*In vitro* antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae)”. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [en línea], 2013, 3(1), pp.122–127. [Consulta: 22 de octubre de 2016]. ISSN 2231-3354. Disponible en: <http://doi.org/10.7324/JAPS.2013.30124>

GONZÁLEZ, M. et al. “La Radiación Ultravioleta. Su Efecto Dañino Y Consecuencias Para La Salud Humana”. *Theoria* [en línea], 2009, 18(2), pp.69–80. [Consulta: 25 de octubre de 2016]. ISSN 0717-196X. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=29917006006>

GUERRERO, D. Actividad hipoglucemiante del extracto de las hojas de *Oreocallis grandiflora* en ratas (*Rattus norvegicus*) por inhibición de alfa-amilasa. [en línea] (Tesis). Escuela Superior

Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2014. pp.38-39. [Consulta: 19 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3428/1/56T00447.pdf>

HOUGHTON, A.; POLSKY, D. “Focus on melanoma”. *Cancer Cell* [en línea], 2002, 2(4), pp.275–278. [Consulta: 25 de octubre de 2016]. ISSN 1535-6108. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00161-7](http://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00161-7)

JANSEN, R. et al. “Photoprotection: Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents”. *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2013, 69(6), pp.1–12. [Consulta: 23 de octubre de 2016]. ISSN 0190-9622. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.08.021>

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. “Photoprotection”. *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2005, 52(6), pp.937–962. [Consulta: 24 de octubre de 2016]. ISSN 0190-9622. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.063>

KUMAR, S.; PANDEY, A. “Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview”. *The ScientificWorld Journal* [en línea], 2013, pp.1-16. [Consulta: 24 de octubre de 2016]. ID 162750. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>

LÓPEZ, F. “Implicaciones dermatológicas del cambio climático y de la disminución de la capa de ozono”. *Actas Dermo-Sifiligráficas* [en línea], 2011, 102(5), pp.311–315. [Consulta: 24 de octubre de 2016]. ISSN 0001-7310. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.ad.2010.12.006>

MARTÍNEZ, A. et al. “Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica”. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2008. pp.1–96. [Consulta: 17 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/manual2008.pdf>

MARTÍNEZ, S. et al. “Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes”. *Nutrición Hospitalaria* [en línea], 2002, 17(6), pp.271–278. [Consulta: 28 de octubre de 2016]. ISSN 0212-1611. Disponible en: http://doi.org/10.3305/nutr_hosp.v17in06.3338

MEJÍA, J.; PUERTAS, M. “Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares”. *Medigraphic Lieratura Biomedica* [en línea], 2014, 12(52), pp.272–281. [Consulta: 28 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm144i.pdf>

MORENO, M.; MORENO, L. “Fotoprotección”. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología* [en línea], 2010, 18, pp.31–39. [Consulta: 27 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://revistasocolderma.org/files/Fotoproteccion.pdf>

NASH, J. “Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products”. *Dermatologic Clinics* [en línea], 2006, 24(1), pp.35–51. [Consulta: 27 de octubre de 2016]. ISSN 0733-8635. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.det.2005.09.006>

ORREGO, C. “Congelación y liofilización”. Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia. 2008. pp.1–26. [Consulta: 17 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7837/1/9789584444363.pdf>

OSORIO, E. “Aspectos básicos de farmacognosia”. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2009. pp.1–82. [Consulta: 24 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Farmacognosia.pdf>

OSTERWALDER, U.; HERZOG, B. “Sun protection factors: World wide confusion”. *British Journal of Dermatology* [en línea], 2009, 161(3), pp.13–24. [Consulta: 5 de octubre de 2016]. ISSN 0007-0963. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09506.x>

PALM, M.; O'DONOGHUE, M. "Update on photoprotection". *Dermatologic Therapy* [en línea], 2007, 20(5), pp.360–376. [Consulta: 8 de octubre de 2016]. ISSN 1396-0296. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00150.x>

PEREZ, V. et al. "Extracción de compuestos fenólicos de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante". *Revista De Ciencias Biológicas Y De La Salud* [en línea], 2013, 15(3), pp.18–22. [Consulta: 10 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.biocetecnia.uson.mx/revistas/articulos/24-Articulo%203.pdf>

REYES, E.; VITALE, M. "Avances en fotoprotección. Mecanismos moleculares implicados". *Piel* [en línea], 2013, 28(4), pp.235–247. [Consulta: 14 de octubre de 2016]. ISSN 0213-9251. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.piel.2012.04.011>

REYNEL, C. "Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies". *Programa Regional ECOBONA-Intercooperation* [en línea], 2010, pp.1-158. [Consulta: 14 de octubre de 2016]. ISSN 1359-7566. Disponible en: <http://doi.org/10.1080/13597569608420974>

RODRÍGUEZ, G. "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*". *Salud Publica de Mexico* [en línea], 2002, 44(5), pp.464–475. [Consulta: 16 de octubre de 2016]. ISSN 0036-3634. Disponible en: <http://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>

ROJAS, A. "Conceptos y práctica de Microbiología general". Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. 2011. pp.1–161. [Consulta: 24 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>

SCHMIDT, C. "Las radiaciones ultravioleta y el cáncer de piel". *Salud Publica de México* [en línea], 2013, 55(1), pp.96–103. [Consulta: 16 de octubre de 2016]. ISSN 0036-3634. Disponible en: <http://doi.org/10.1590/S0036-36342013000100014>

SILVA, R. et al. “*In vitro* photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation”. *Industrial Crops and Products* [en línea], 2016, 83, pp.509–514. [Consulta: 17 de octubre de 2016]. ISSN 0926-6690. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.077>

SKIN CANCER FOUNDATION. *Skincancer.org* [blog]. 2016. [Consulta: 12 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information>

UNAM. “Técnicas Cromatográficas”. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. 2007. pp.1-123. [Consulta: 21 de octubre de 2016]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf

URBINA, E. Actividad fotoprotectora *in vitro* de los extractos de *Parmelina tiliácea*. [en línea] (Tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Riobamba, Ecuador. 2016. pp.31-32. [Consulta: 19 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4889/1/56T00615%20UDCTFC.pdf>

VALDIVIELSO, M.; HERRANZ, J. “Actualización en fotoprotección infantil”. *Anales de Pediatría* [en línea], 2010, 72(4), pp.1-7. [Consulta: 17 de octubre de 2016]. ISSN 1695-4033. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.anpedi.2009.06.013>

WAGNER, H. et al. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas* [en línea]. Translated by Th. A. Scott. New York, EE.UU. Ed. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. 2001. [Consulta: 19 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://sci-hub.bz/10.1007/978-3-662-02398-3>

WOLF, R. et al. “Sunscreens”. *Clinics in Dermatology* [en línea], 2001, 19(4), pp.452–459. [Consulta: 19 de octubre de 2016]. ISSN 0738-081X. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0738-081X\(01\)00190-0](http://doi.org/10.1016/S0738-081X(01)00190-0)

WONG, C. et al. “Basal cell carcinoma”. *Clinical review* [en línea], 2003, 327, pp.794–798. [Consulta: 20 de octubre de 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC214105/>

WU, S.; NG, L. “Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan”. *Food Science and Technology* [en línea], 2008, 41(2), pp.323–330. [Consulta: 20 de octubre de 2016]. ISSN 0023-6438. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.003>

ANEXOS

ANEXO A: Guía de movilización y entrega de muestras vegetales al Herbario de la Espoch.

GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRES
Nro 002-2016



Fecha de emisión: 02/05/2016, 11h30 (Fecha y hora).
Fecha de movilización: 02-05-2016 Válido hasta: 03-05-2016 - 11h30 (Fecha y hora, máx 24 horas)

La Dirección Provincial de CHIMBORAZO Autoriza a: Dennis Cajamarca Cédula de identidad N° 0604067538 de nacionalidad ecuatoriana, **para la movilización de especímenes de flora desde: la ciudad de parroquia Juan de Velasco, Cantón COLTA en la provincia Chimborazo, hacia: Riobamba,** provincia de Chimborazo, HERBARIO de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: **de acuerdo al siguiente detalle:**

Nombre Científico	Nombre Común	Descripción del espécimen o parte constitutiva	Estado	Cantidad
Oreocallis grandiflora	Cucharilla	Tallo con hojas y flores	prensado	2 1
TOTAL				2 1

Observaciones: El sector en donde se realizó la colecta barrio - El Laurel, bosque intervenido, parroquia Juan de Velasco, cantón Colta.
Autorización de Investigación Científica N° 003-16 IC-DPACH-MAE-2016 FLORA, del Proyecto de Investigación Científica Denominado **“DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA in vitro DE LOS EXTRACTOS DE Oreocallis grandiflora,**

Los especímenes o elementos constitutivos se movilizarán en:
Vehículo: Ford Ranger 4x4 doble cabina Color: Verde **Placa:** HCG 891
Conductor: DENNIS CAJAMARCA **C.I.** 0604067538
Motivo de movilización:
Traslado a Unidad de manejo (X) Nombre: Herbario ESPOCH.
Investigación (X) Nombre: **“ DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA in vitro DE LOS EXTRACTOS DE Oreocallis grandiflora” AIC N° 003-IC-DPACH MAE 2016.**
Exhibición itinerante () Nombre:.....
Comercio ()
Otros ()


 DIRECTOR(A) PROVINCIAL DEL AMBIENTE
ENTREGO CONFORME


 DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE CHIMBORAZO



 RESPONSABLE DE LA U. VIDA SILVESTRE
MINISTERIO DEL AMBIENTE


Recibido


 04/05/2016

 F.R.N.

ANEXO B: Autorización de Investigación Científica.

 **Ministerio del Ambiente**


GOBIERNO NACIONAL DE LA REPUBLICA DEL ECUADOR


Oficio Nro. MAE-DPACH-2016-0582
Riobamba, 13 de abril de 2016

Señor
Dennis Santiago Cajamarca Guaman
Estudiante
En su Despacho

En atención de su oficio del 4 de abril del 2016, y una vez que ha cumplido con las observaciones efectuadas y el pago de la tasa respectiva, hago la entrega de la Autorización de Investigación Científica N° 003 IC-DPACH-MAE del 12 de abril del 2016, siendo necesario recomendarle se observe las obligaciones que Ud tiene en su calidad de Investigador Principal en el proyecto denominado "**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS DE Oreocallis grandiflora**".

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,


DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO
Ing. Marcelo Patricio Pino Cáceres
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO, ENCARGADO

Referencias:
- MAE-DPACH-2016-0615

Anexos:
- aut_inv_003_oreocallis_grandiflora_-_cajamarca_cf..pdf

ma

Papel Ecológico

* Documento generado por Quijux

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO
Av. 9 de Octubre y Duchicela, Quinta Macaji
Riobamba - Ecuador
Código Postal: 060103
Teléfono: (593 3) 261 0029
www.ambiente.gob.ec

1/1

ANEXO C: Análisis estadístico del efecto de protección solar

Resultados del porcentaje de supervivencia de *Escherichia coli*

BLANCO	OMC, 20 ppm	PAD, 20 ppm	O.g. 20 ppm	O.g. 200 ppm	O.g. 2000 ppm
0,0000	1,4300	2,0000	1,1900	4,0000	14,6600
0,0000	1,7400	1,7900	2,5000	3,2100	12,0000
0,0000	0,0000	0,0000	1,8500	5,4700	13,2400

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE *Escherichia coli* TOMANDO COMO REFERENCIA OCTILMETOXICINAMATO A 20 ppm.

One Way Analysis of Variance

Viernes, Octubre 21, 2016, 11:50:36

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,300)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,861)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
OMC, 20 ppm	3	0	1,057	0,928	0,536
PAD, 20 ppm	3	0	1,263	1,099	0,635
O. g., 20 ppm	3	0	1,847	0,655	0,378
O. g., 200 ppm	3	0	4,227	1,147	0,662
O. g., 2000 ppm	3	0	13,300	1,331	0,768

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	320,272	80,068	71,674	<0,001
Residual	10	11,171	1,117		
Total	14	331,443			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
OMC, 20 ppm vs. O. g., 2000	12,243	14,187	<0,001	Yes
OMC, 20 ppm vs. O. g., 200 ppm	3,170	3,673	0,014	Yes
OMC, 20 ppm vs. O. g., 20 ppm	0,790	0,915	0,771	No
OMC, 20 ppm vs. PAD, 20 ppm	0,207	0,239	0,997	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE *Escherichia coli* TOMANDO COMO REFERENCIA PAMIDATO A 20 ppm.

One Way Analysis of Variance

Viernes, Octubre 21, 2016, 11:50:52

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,300)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,861)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
OMC, 20 ppm	3	0	1,057	0,928	0,536
PAD, 20 ppm	3	0	1,263	1,099	0,635
O. g., 20 ppm	3	0	1,847	0,655	0,378
O. g., 200 ppm	3	0	4,227	1,147	0,662
O. g., 2000 ppm	3	0	13,300	1,331	0,768

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	320,272	80,068	71,674	<0,001
Residual	10	11,171	1,117		
Total	14	331,443			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnnett's Method):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
PAD, 20 ppm vs. O. g., 2000	12,037	13,948	<0,001	Yes
PAD, 20 ppm vs. O. g., 200 ppm	2,963	3,434	0,021	Yes
PAD, 20 ppm vs. O. g., 20 ppm	0,583	0,676	0,899	No
PAD, 20 ppm vs. OMC, 20 ppm	0,207	0,239	0,997	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Descriptivos

% DE SUPERVIVENCIA DE *E. coli*

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
OMC (20 ppm)	3	1,0567	,92813	,53586	-1,2489	3,3623	,00	1,74
PAD (20 ppm)	3	1,2633	1,09911	,63457	-1,4670	3,9937	,00	2,00
O.g (20 ppm)	3	1,8467	,65501	,37817	,2195	3,4738	1,19	2,50
O.g (200 ppm)	3	4,2267	1,14692	,66218	1,3776	7,0758	3,21	5,47
O.g (2000 ppm)	3	13,3000	1,33101	,76846	9,9936	16,6064	12,00	14,66
Total	15	4,3387	4,86564	1,25630	1,6442	7,0332	,00	14,66

Prueba de homogeneidad de varianzas

% DE SUPERVIVENCIA DE *E. coli*

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
,424	4	10	,788

Pruebas de normalidad

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% DE SUPERVIVENCIA DE <i>E. coli</i> OMC (20 ppm)	,323	3	.	,879	3	,320
PAD (20 ppm)	,351	3	.	,828	3	,183
O.g (20 ppm)	,175	3	.	1,000	3	,992
O.g (200 ppm)	,245	3	.	,971	3	,672
O.g (2000 ppm)	,185	3	.	,998	3	,925

a. Corrección de significación de Lilliefors

ANOVA

% DE SUPERVIVENCIA DE *E. coli*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	320,272	4	80,068	71,674	,000
Dentro de grupos	11,171	10	1,117		
Total	331,443	14			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: % DE SUPERVIVENCIA DE E. coli

HSD Tukey

(I) SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	(J) SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
OMC (20 ppm)	PAD (20 ppm)	-,20667	,86298	,999	-3,0468	2,6335
	O.g (20 ppm)	-,79000	,86298	,885	-3,6301	2,0501
	O.g (200 ppm)	-3,17000 [*]	,86298	,028	-6,0101	-,3299
	O.g (2000 ppm)	-12,24333 [*]	,86298	,000	-15,0835	-9,4032
PAD (20 ppm)	OMC (20 ppm)	,20667	,86298	,999	-2,6335	3,0468
	O.g (20 ppm)	-,58333	,86298	,957	-3,4235	2,2568
	O.g (200 ppm)	-2,96333 [*]	,86298	,040	-5,8035	-,1232
	O.g (2000 ppm)	-12,03667 [*]	,86298	,000	-14,8768	-9,1965
O.g (20 ppm)	OMC (20 ppm)	,79000	,86298	,885	-2,0501	3,6301
	PAD (20 ppm)	,58333	,86298	,957	-2,2568	3,4235
	O.g (200 ppm)	-2,38000	,86298	,113	-5,2201	,4601
	O.g (2000 ppm)	-11,45333 [*]	,86298	,000	-14,2935	-8,6132
O.g (200 ppm)	OMC (20 ppm)	3,17000 [*]	,86298	,028	,3299	6,0101
	PAD (20 ppm)	2,96333 [*]	,86298	,040	,1232	5,8035
	O.g (20 ppm)	2,38000	,86298	,113	-,4601	5,2201
	O.g (2000 ppm)	-9,07333 [*]	,86298	,000	-11,9135	-6,2332
O.g (2000 ppm)	OMC (20 ppm)	12,24333 [*]	,86298	,000	9,4032	15,0835
	PAD (20 ppm)	12,03667 [*]	,86298	,000	9,1965	14,8768
	O.g (20 ppm)	11,45333 [*]	,86298	,000	8,6132	14,2935
	O.g (200 ppm)	9,07333 [*]	,86298	,000	6,2332	11,9135

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

% DE SUPERVIVENCIA DE E. coli

HSD Tukey^a

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
OMC (20 ppm)	3	1,0567		
PAD (20 ppm)	3	1,2633		
O.g (20 ppm)	3	1,8467	1,8467	
O.g (200 ppm)	3		4,2267	
O.g (2000 ppm)	3			13,3000
Sig.		,885	,113	1,000

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

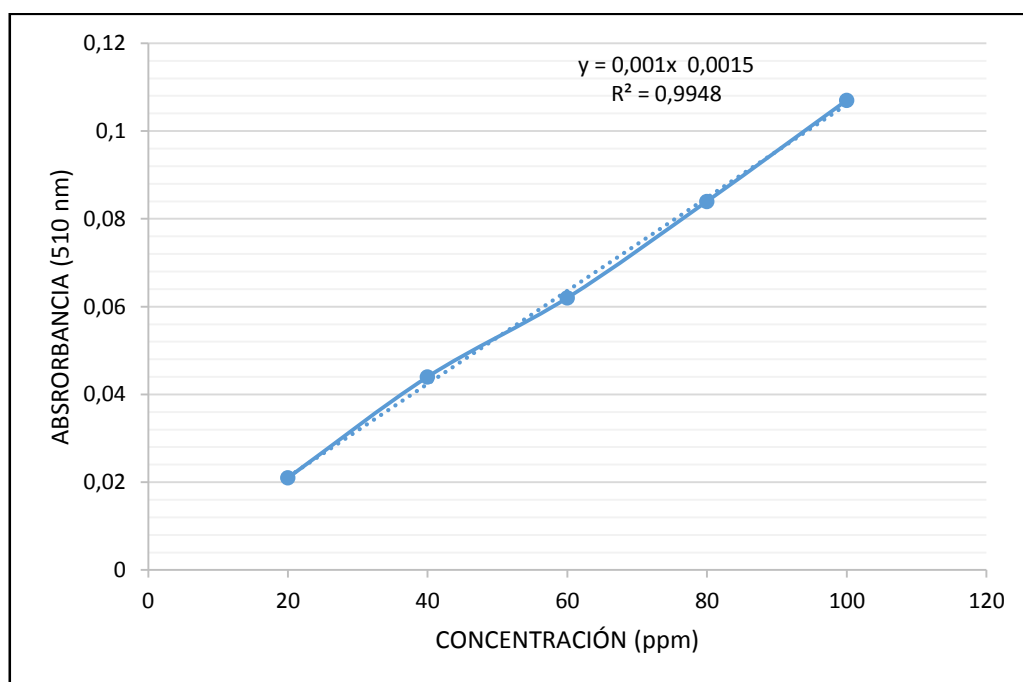
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016

ANEXO D: Curva de calibración del estándar de quercetina




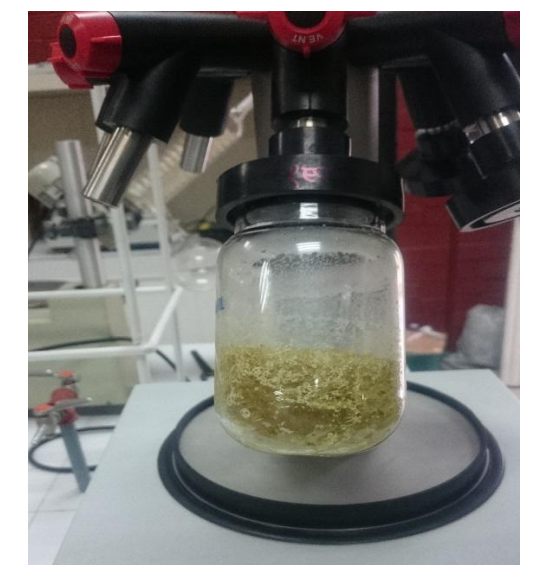

CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA (510 nm)
20	0.021
40	0.044
60	0.062
80	0.084
100	0.107

FUENTE: Chávez, 2016



FUENTE: Chávez, 2016

ANEXO E: Evidencia fotográfica del trabajo de investigación.

Control de calidad de la droga cruda	Preparación de unidades experimentales
	
Obtención del extracto hidroalcohólico	Obtención del extracto seco
	
Exposición de bacterias E. coli a radiación UVB para comprobar la actividad fotoprotectora	
	

UFC sobrevivientes en cada intervalo de tiempo.



Realizado por: Dennis Cajamarca, 2016