



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium murale***

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:** TOBAR MEDINA ÁNGEL PAÚL

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

Riobamba – Ecuador

2016

## **DERECHO DE AUTOR**

©2016, Ángel Paúl Tobar Medina

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.

## CERTIFICACIÓN

### ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

#### FACULTAD DE CIENCIAS

#### ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Chenopodium murale*, de responsabilidad del señor Ángel Paúl Tobar Medina, ha sido minuciosamente 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**

Dra. Susana Abdo

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

BQF. Cecilia Toaquiza

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**DOCUMENTALISTA**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**SISBIB ESPOCH**

## **DERECHOS INTELECTUALES**

Yo, Ángel Paúl Tobar Medina soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

---

ÁNGEL PAÚL TOBAR MEDINA

## **DEDICATORIA**

A mi madre, por brindarme su apoyo incondicional, su ánimo e inculcarme una personalidad, fuerte, ganadora y luchadora, por hacer posible mi realización personal como profesional.

A mis abuelos por regalarme su compañía, paciencia, sabiduría y palabras de aliento durante todo este camino.

A mis amigos que siempre estuvieron ahí impulsando mis ganas de seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTO**

Toda mi gratitud está dirigida a Dios que ha permitido y ha sido el artífice de este logro.

A mi madre por haberme enseñado ese espíritu de lucha y constancia, gracias al cual no habría podido cumplir esta meta, y que gracias a ella soy la persona que siempre quise ser, y la que va seguir brindándole alegrías mediante mis éxitos, este es tan solo el primero de todos los que vendrán adelante. Gracias madre.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por permitirme dar un paso más en el escalón profesional.

A mi tutor, BQF Diego Vinueza Tapia, M.Sc., quien aparte de guiarme con su conocimiento y paciencia, se convirtió en un muy buen amigo que estuvo apoyándome a lo largo de esta investigación, en buenos momentos y en las adversidades.

## TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....	I
DERECHO DE AUTOR .....	II
CERTIFICACIÓN.....	III
DERECHOS INTELECTUALES .....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO .....	VI
RESUMEN.....	XIV
SUMMARY .....	XV
INTRODUCCIÓN .....	1

## CAPÍTULO I

1	MARCO TEÓRICO .....	3
1.1	Cáncer de piel.....	3
1.2	Melanoma maligno.....	3
1.3	Cáncer de piel no melanoma .....	4
1.4	Radiación UV.....	4
1.5	Índice UV .....	5
1.6	Condiciones que aumentan la intensidad de la radiación UV.....	5
1.7	Efecto de la radiación UV en los seres humanos .....	6
1.8	Relación altitud – radiación UV – melanoma .....	6
1.9	Dosis Eritémica Mínima .....	8
1.10	Fotoprotección.....	8
1.11	Fotoprotección Natural.....	8
1.11.1	<i>Barrera cutánea</i> .....	8
1.11.2	<i>Sistema pigmentario</i> .....	9
1.11.3	<i>Pilosidad</i> .....	9
1.11.4	<i>Pigmentos carotenoides</i> .....	9
1.11.5	<i>Enzimas antioxidantes</i> .....	9
1.11.6	<i>Sistemas de reparación del ADN</i> .....	9
1.12	Fotoprotección externa .....	10
1.12.1	<i>Pantallas</i> .....	10
1.12.2	<i>Filtros</i> .....	10
1.12.3	<i>Trampas de radicales libres</i> .....	11
1.13	Filtros químicos u orgánicos .....	11

<b>1.14</b>	<b>Agentes antioxidantes</b> .....	12
<i>1.14.1</i>	<i>Carotenoides</i> .....	13
<i>1.14.2</i>	<i>Polifenoles</i> .....	13
<b>1.15</b>	<b>Evolución de los flavonoides</b> .....	14
<b>1.16</b>	<b>Mecanismos de acción de los flavonoides sobre la radiación UV</b> .....	15
<b>1.17</b>	<b>Fototipo de piel</b> .....	15
<b>1.18</b>	<b>Plantas C4</b> .....	17
<b>1.19</b>	<b><i>Chenopodium murale</i></b> .....	19
<i>1.19.1</i>	<i>Taxonomía</i> .....	19
<i>1.19.2</i>	<i>Ficha Técnica</i> .....	19
<b>1.20</b>	<b>Muerte Celular Inducida</b> .....	22
<b>1.21</b>	<b>Estándar Mcfarland</b> .....	22
<b>1.22</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b> .....	22
<b>1.23</b>	<b>Cromatografía en Capa Fina (TLC)</b> .....	23
<b>1.24</b>	<b>Liofilización</b> .....	24
<i>1.24.1</i>	<i>Etapas del proceso:</i> .....	24
<i>1.24.2</i>	<i>Ventajas de la liofilización:</i> .....	25
<i>1.24.3</i>	<i>Inconvenientes de la liofilización:</i> .....	25

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	26
<b>2.1</b>	<b>Adquisición del permiso para trabajar con la especie vegetal</b> .....	26
<b>2.2</b>	<b>Recolección y acondicionamiento de la muestra vegetal.</b> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Control de calidad del material vegetal</b> .....	26
<i>2.3.1</i>	<i>Determinación del contenido de humedad</i> .....	26
<i>2.3.2</i>	<i>Determinación de cenizas totales</i> .....	27
<i>2.3.3</i>	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i> .....	28
<i>2.3.4</i>	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i> .....	29
<b>2.4</b>	<b>Tamizaje Fitoquímico</b> .....	30
<i>2.4.1</i>	<i>Obtención de extractos etéreo, etanólico y acuoso</i> .....	30
<i>2.4.2</i>	<i>Pruebas de Tamizaje</i> .....	31
<b>2.5</b>	<b>Obtención del extracto seco de <i>Chenopodium murale</i></b> .....	31
<b>2.6</b>	<b>Preparación de los subextractos</b> .....	32
<b>2.7</b>	<b>Preparación del Estándar McFarland</b> .....	32
<b>2.8</b>	<b>Ensayo de muerte celular inducida</b> .....	33



2.9	Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) .....	33
2.10	Cromatografía en capa fina.....	34
2.11	Cuantificación de flavonoides totales .....	34
2.12	Barrido por Espectrofotometría UV .....	35

### CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	36
3.1	Extracto seco.....	36
3.2	Control de calidad del material vegetal.....	36
3.3	Tamizaje Fitoquímico .....	36
3.4	Ensayo de muerte celular inducida.....	38
	<i>Extracto etanólico de Chenopodium murale a 20 ppm.</i> .....	43
	<i>Extracto etanólico de Chenopodium murale a 200 ppm.</i> .....	43
	<i>Extracto etanólico de Chenopodium murale a 2000 ppm.</i> .....	43
3.5	Factor de Protección Solar .....	45
3.6	Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	48
3.7	Cuantificación de flavonoides totales .....	50
3.8	Barrido por Espectrofotometría UV .....	50
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	55
	<b>RECOMENDACIONES:</b> .....	56
	<b>BIBLIOGRAFÍA:</b> .....	57
	<b>ANEXOS</b> .....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-3</b>	Resultados sobre los análisis de control de calidad del material vegetal.....	36
<b>Tabla 2-3</b>	Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico del extracto etéreo .....	36
<b>Tabla 3-3</b>	Resultados de las pruebas del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico .....	37
<b>Tabla 4-3</b>	Resultados de las pruebas de tamizaje del extracto acuoso .....	37
<b>Tabla 5-3</b>	UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, bajo protección de los extractos etanólicos de <i>Ch. murale</i> a 20, 200 y 2000 ppm. ....	39
<b>Tabla 6-3</b>	UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, bajo protección de PAMIDATO .....	40
<b>Tabla 7-3</b>	UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, bajo protección de OCTILMETOXICINAMATO.....	40
<b>Tabla 8-3</b>	Taza de viabilidad celular total al final del ensayo de muerte celular inducida. ..	42
<b>Tabla 9-3</b>	Absorbancias del extracto etanólico de <i>Ch. murale</i> a 20 ppm, en el rango de 290 a 320 nm. ....	46
<b>Tabla 10-3</b>	Valores de FPS del extracto de <i>Ch. murale</i> 20 ppm, OMC y PAMIDATO .....	47
<b>Tabla 11-3</b>	Resultados de la Cromatografía en Capa Fina comparados con los compuestos de referencia de las Series A y B .....	49
<b>Tabla 12-3</b>	Cuantificación de Flavonoides Totales en el extracto de <i>Ch. murale</i> expresados en porcentaje de equivalentes de quercetina por miligramo.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-3</b>	UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, fotoprotección de los extractos etanólicos de <i>Ch. murale</i> a 20, 200 y 2000 ppm. ....	39
<b>Figura 2-3</b>	UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, fotoprotección de PAMIDATO. ....	40
<b>Figura 3-3</b>	UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, fotoprotección de OCTIL METOXICINAMATO. ....	41
<b>Figura 4-3</b>	Taza de viabilidad celular total al final del ensayo de muerte celular inducida. .	42
<b>Figura 5-3</b>	UFC sobrevivientes después de la exposición a radiación UVB vs tiempo (Fotoprotección de <i>Chenopodium murale</i> ) .....	44
<b>Figura 6-3</b>	UFC sobrevivientes después de la exposición a radiación UVB vs tiempo (Fotoprotección de Pamidato).....	44
<b>Figura 7-3</b>	UFC sobrevivientes después de la exposición a radiación UVB vs tiempo (Fotoprotección de OMC).....	45
<b>Figura 8-3</b>	Valores de FPS del extracto etanólico de <i>Ch. murale</i> 20 ppm, OMC y PAMIDATO .....	47
<b>Figura 9-3</b>	Espectro UV de la solución alcohólica de <i>Ch. murale</i> .....	51
<b>Figura 10-3</b>	Espectro UV de la solución alcohólica de <i>Ch. murale</i> .....	51
<b>Figura 11-3</b>	Espectro UV de la solución clorofórmica de <i>Ch. murale</i> .....	52

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-1</b>	Prevalencia de melanoma a intervalos de 100 metros y dosis eritemática diaria en función de la altitud en la provincia de Granada.....	7
<b>Gráfico 2-1</b>	Estructuras de los principales grupos de flavonoides .....	14
<b>Gráfico 3-1</b>	Fototipos cutáneos .....	16
<b>Gráfico 4-1</b>	Test de evaluación para determinar el fototipo cutáneo. ....	17
<b>Gráfico 5-1</b>	Fototipo de piel clasificado de acuerdo a sus características .....	17
<b>Gráfico 6-1</b>	Diagrama de Presión – Temperatura de los estados del agua.....	24
<b>Gráfico 1-3</b>	Nomenclatura COLIPA de índices de protección UVB .....	48
<b>Gráfico 2-3</b>	Placa cromatográfica del extracto alcohólico de <i>Chenopodium murale</i> .....	49
<b>Gráfico 3-3</b>	Grupos cromóforos de los flavonoides .....	52
<b>Gráfico 4-3</b>	Bandas de absorción de los diferentes tipos de flavonoides .....	53
<b>Gráfico 5-3</b>	Espectro de la solución etanólica de PAMIDATO .....	53
<b>Gráfico 6-3</b>	Espectro de la solución etanólica de OMC .....	54
<b>Gráfico 7-3</b>	Espectro de la solución acuosa de OMC .....	54
<b>Gráfico 8-3</b>	Espectro de la solución acuosa de OMC .....	54

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A:</b>	Tamizaje Fitoquímico .....	62
<b>Anexo B:</b>	Obtención del extracto .....	62
<b>Anexo C:</b>	Cromatografía en Capa Fina .....	64
<b>Anexo D:</b>	UFC sobrevivientes a la radiación UVB.....	65
<b>Anexo E:</b>	Análisis estadístico de los extractos etanólicos de <i>Chenopodium murale</i> .....	66
<b>Anexo F:</b>	Curva de calibración de quercetina para el cálculo de Flavonoides Totales. ....	68
<b>Anexo G:</b>	Autorización de Investigación Científica otorgada por el MAE.....	69

## RESUMEN

En el presente estudio se determinó la actividad fotoprotectora y el factor de protección solar (FPS) de la especie vegetal Malla (*Chenopodium murale*), planta que crece en ambientes de radiación extrema, y posee un mecanismo fotosintético C4. La incidencia de cáncer de piel ha aumentado en Ecuador, propiciando la búsqueda de alternativas en protección contra la radiación ultravioleta B (UVB). Para comprobar la efectividad de malla, se realizó el ensayo de muerte celular inducida por radiación UVB a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), bajo protección de extractos etanólicos de malla, de 20 ppm, 200 ppm y 2000 ppm. Se prepararon suspensiones bacterianas de *E. coli* de acuerdo al estándar McFarland 0.5, en tubos de cuarzo y se formaron unidades experimentales con los extractos etanólicos. Las bacterias fueron sometidas a radiación UVB en 7 repeticiones, después de cada repetición se sembró en agar nutritivo, observando el crecimiento bacteriano. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) sobrevivientes se transformó en porcentaje de viabilidad celular y se comparó con los controles Octilmetoxicinamato (OMC) y Pamidato. El FPS se calculó mediante espectrofotometría y la aplicación de la ecuación de Mansur. Se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos para identificar los compuestos responsables de la actividad fotoprotectora. Finalmente, se comprobó que el extracto etanólico de malla preparado a 2000 ppm presentó la actividad fotoprotectora más elevada con una tasa de viabilidad celular del 10.75%. El FPS del extracto etanólico de malla a 20 ppm fue de 1.12. Se comprobó la presencia de tres compuestos responsables de la actividad fotoprotectora, kaempferol-3-O-gentobioside, kaempferol-3,7-O-dirhamnósido, e isorhamnetin-3-O-glucósido. Se concluyó que la planta estudiada no presentó la actividad fotoprotectora esperada de acuerdo al método propuesto por Ávila Acevedo. Se recomienda estandarizar el ensayo de muerte celular inducida para futuros ensayos de fotoprotección.

**PALABRAS CLAVE:** <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS MÉDICAS>, <BIOQUÍMICA>, <MALLA (*Chenopodium murale*)>, <ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA>, <FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)>, <FOTOPROTECCIÓN>, <RADIACIÓN ULTRAVIOLETA B (UVB)>, <VIABILIDAD CELULAR>.

## SUMMARY

The photoprotection, the sun protection factor (SPF) and the C4 photosynthesis of *Chenopodium murale* growing in extreme radiation zones were determined in this research. New alternatives against ultraviolet-B (UVB) radiation are being investigated because the incidence of skin cancer has increased in Ecuador. To determine the plant efficiency, ultraviolet B radiation-induced cell death in *Escherichia coli* ATCC 25922 using ethanol extracts of *Chenopodium murale* at 20 ppm, 200 ppm and 2 000 ppm was done. Bacterial suspensions of *E. coli* using Mcfarland 0.5 turbidity standards in quartz tubes were prepared and experimental units were established. The bacteria were exposed to UVB radiation in seven replicates. After each replicate, a bacterium growth observing-nutrient agar was sowed. The number of colony forming units (CFU) surviving was turned into percentage of viable cell and it was compared with Octyl-methoxycinnamate (OMC) and Pamidate. The SPF was calculated using spectrophotometry and applying Mansur equation. A thin-layer chromatography (TLC) of extracts was used to identify the compounds responsible for the photoprotection. Finally, the ethanol extract of *Chenopodium murale* prepared at 200 ppm showed the highest photoprotection with a viable cell rate of 10.75%. The ethanol extract SPF of *Chenopodium murale* at 20 ppm was 1.12. Kaempferol-3-O-gentobioside, kaempferol-3,7-O-di-rhamnoside and isorhamnetin-3-O-glucoside compounds responsible for photoprotection were found. We conclude that *Chenopodium murale* did not show the expected photoprotection according to the method posed by Ávila Acevedo. We recommend to standardize the induced cell death for further studies of photoprotection.

**KEYWORDS:** TECHNOLOGY AND MEDICINE , BIOCHEMISTRY , *Chenopodium murale* , PHOTOPROTECTION ACTITIVITY , SUN PROTECTION FACTOR (SPF) , PHOTOPROTECTION , ULTRAVIOLET-B (UVB) RADIATION , VIABLE CELL ,

## INTRODUCCIÓN

Debido al aumento de casos de cáncer de piel en nuestro país, y a su ubicación geográfica, es de gran importancia buscar nuevas y mejores alternativas para luchar contra esta enfermedad. Una que tenemos a nuestro alcance es el uso de plantas, ya que muchas de ellas presentan mecanismos de defensa contra la radiación solar, gracias a compuestos presentes en su composición química.

Dichos compuestos pueden ser estudiados para conocer qué tan viables o aplicables son en seres humanos para cumplir con el objetivo de protección frente a la radiación UVB. Según datos de SOLCA (Sociedad de Lucha contra el Cáncer), en los próximos años, 13 de cada 100000 habitantes presentarán cáncer de piel, esto se debe a la ubicación geográfica de nuestro país en donde la radiación llega de manera perpendicular y con mayor intensidad (El Tiempo 2015).

La OMS ha creado un índice de radiación a la que nos sometemos los seres humanos, en este índice se ha hecho una clasificación: radiación baja: 1-2 UVI, radiación moderada: 3-4 UVI, requiere protección: 5-7 UVI, radiación extrema: 8-11 UVI (El Tiempo 2015).

Como se puede observar el valor máximo de radiación a la que nos podemos llegar a exponer es de 11 UVI, sin embargo en nuestro país éste índice de radiación puede llegar hasta los 14 UVI en Guayaquil (costa), y los 24 UVI en Quito, por lo que se deduce que en todas la sierra (ciudades de mayor altitud), este índice debe asemejarse al de la capital, debido a las características geográficas y su relación con la intensidad de la radiación (EXA 2008).

Sin embargo un estudio realizado por la FEPSO (Fundación Ecuatoriana de Psoriasis), el cáncer de piel ha aumentado en un 5000%, ya que por cada 100000 personas, una presentaba cáncer de piel, y hoy en día una de cada 200 personas padece esta enfermedad. Por lo que de cada 100 casos nuevos de cáncer, 20 son casos de cáncer de piel. Todos estos datos son manejados por el MSP y SOLCA, quienes aseguran que el cáncer de piel lidera como el cáncer más común en la mujeres y en segundo lugar en los hombres, esto durante el último quinquenio (La Hora 2011).

Una vez visto toda esta incidencia de cáncer de piel durante los últimos 5 años y las condiciones geográficas del territorio nacional donde la radiación llega de manera más intensa y directa a la población, es importante buscar nuevas formas de protección contra la radiación solar, por lo que esta investigación ha permitido evaluar compuestos de origen natural que sirvan como barreras o filtros solares.

Para ello se obtuvo el extracto de la planta objeto de estudio, *Chenopodium murale*, posteriormente se identificaron los compuestos que posiblemente presentaron actividad



fotoprotectora, la misma que se evaluó mediante un ensayo de muerte celular inducida, en donde se observó la tasa de viabilidad celular después de exposición a radiación UVB, y bajo protección del extracto de la planta.

Se escogió a la especie *Chenopodium murale* debido a que es una planta que crece en condiciones extremas de luz solar, y ambientes secos, presenta un mecanismo fotosintético de tipo C4, por lo que se presume que pueda tener compuestos que brinden actividad fotoprotectora, es decir que presenten protección frente a la radiación solar UVB, que es la que produce daño a nivel celular y de la que se debe buscar protección.

De esta manera esta investigación contribuirá con la identificación de nuevos compuestos que podrían ser utilizados como filtros solares naturales, los mismos que después de los estudios correspondientes podrán ser aprobados para ser utilizados en formulaciones tópicas, ya sea en conjunto con otros filtros o en solitario en nuevas formulaciones. Así se podrá ir mejorando la protección contra la radiación UVB y disminuyendo la incidencia de cáncer de piel en nuestro país.

# CAPÍTULO I

## 1 MARCO TEÓRICO

### 1.1 Cáncer de piel

El cáncer de piel es la enfermedad tumoral maligna más común en sujetos de raza blanca, con incidencia creciente en diferentes poblaciones. En el conjunto de neoplasias malignas de la piel se incluyen tumores de diferentes características, entre los que se puede distinguir dos grandes grupos: melanoma cutáneo (MC) y cáncer de piel no melanoma (CNM).

En el mundo se presentan en promedio 160.000 casos nuevos de MC por año, que causan el 90% de la mortalidad por cáncer de piel, y la supervivencia a 5 años de los pacientes con melanoma metastásico solo alcanza el 5%. Por otra parte, aunque diferentes estudios han registrado tasas bajas de mortalidad por CNM, cercanas a 0,9/100.000 personas/año. Esta enfermedad genera una alta carga para la salud pública, debido a su efecto en la morbilidad y los costes ocasionados al sistema general de salud (Sánchez et al. 2011).

### 1.2 Melanoma maligno

El melanoma maligno (MM) es un tumor originado en células neuroectodérmicas, formado a partir de melanocitos. Es una neoplasia compleja, heterogénea, cuyas tasas de incidencia varían entre géneros, edad, grupos étnicos y regiones. Se han encontrado diferentes patrones de presentación del MM que son específicos por edad, con vías causales diferentes, manifestando la heterogeneidad en su presentación.

Así mismo se cuenta como el tercero en frecuencia de las neoplasias cutáneas y es la forma más letal de cáncer de piel, causando aproximadamente el 78% de todas las muertes. Por su incidencia, que se ha incrementado rápidamente (aproximadamente 3,1 por año en los últimos 20 años), el melanoma se constituye en un importante problema de salud pública (Pozzobon et al. 2013).

### **1.3 Cáncer de piel no melanoma**

El cáncer de piel no melanoma es el cáncer más común entre la población caucasiana y su incidencia está en continuo aumento, siendo el carcinoma basocelular el más frecuente (Sabando Carranza, Dos Santos Alentar y Calvo Carrasco 2015).

### **1.4 Radiación UV**

La radiación ultravioleta es el factor de riesgo dominante. El espinocelular es el modelo de cáncer fotoinducido, siendo la exposición solar crónica su principal causa. Como la dosis es acumulativa, es característico de edades avanzadas y localizado en zonas fotoexpuestas. No obstante, la exposición moderada durante actividades de ocio-deportes podría ser protectora, salvo cuando es intensa o prolongada (Sabando Carranza, Dos Santos Alentar y Calvo Carrasco 2015).

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.

La radiación UV se divide en tres bandas: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320), y la UVC (200 a 280 nm). La UVA no es filtrada por la capa de ozono en el mismo grado que la UVB y la UVC, y cantidades suficientes de la misma penetran a través de las nubes y de los vidrios.

En un día de verano, la UVB comprende aproximadamente el 5% de la radiación UV, y la UVA el 95% restante. 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.

La cantidad de radiación UV y luz visible que alcanzan un cierto nivel de la piel varía con su longitud de onda. En general, las longitudes de onda largas penetran más profundamente, lo cual se puede explicar por las propiedades ópticas de la piel.

Cuando la luz visible y la UV alcanzan 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 es la más importante ya que se trata de la energía que puede causar respuestas tisulares.

La radiación es absorbida por moléculas en la piel denominadas cromóforos, los cuales pueden ser endógenos (por ejemplo, el DNA, la melanina, el ácido urocánico, pequeños péptidos, y el colesterol) o exógenos (drogas fotosensibilizantes) capaces de inducir una respuesta fotobiológica, como una quemadura solar o una fotosensibilidad inducida por drogas.

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 (Cabrera Morales y López-Nevot 2006).

## **1.5 Índice UV**

El índice UV es una medida de la radiación ultravioleta que golpea la superficie terrestre y también sirve como indicador del efecto de la radiación sobre la piel de los humanos. Este índice se obtuvo a partir de comprobar, que la cantidad de la dosis efectiva que se acumula por metro cuadrado de piel, al ser expuesta a la radiación UV durante una hora, era de 0 a 1500 Joules.

De esta manera se designó con el número 1 a la cantidad de 100 J/m<sup>2</sup> hora, 2 a la cantidad de 200 J/m<sup>2</sup> hora, así sucesivamente hasta el índice número 16, que es el mayor de esta escala.

La dosis efectiva se obtiene mediante la multiplicación de la intensidad de la radiación UV, por el tiempo de exposición a la piel y por el Efecto de acción de eritema que es un factor del efecto de la radiación sobre la piel (CONIDA 2008).

## **1.6 Condiciones que aumentan la intensidad de la radiación UV**

Hay que considerar que no siempre es la intensidad de la radiación UV es la misma, y ésta va a depender de la época de año, de la hora del día, de la latitud y de la altitud. Una vez dicho esto, la radiación más intensa se da en verano, en las horas centrales del día, a latitudes más bajas y altitudes elevadas.

También hay que tomar en cuenta que la cantidad y la calidad de la radiación van a depender de la energía solar emitida y de las características de la atmósfera en el lugar en donde penetra la radiación. Las nubes que contienen agua ayudan a neutralizar la radiación infrarroja más que la ultravioleta, sólo las tormentas demasiado cargadas de humedad y muy densas logran evitar la incidencia de la radiación UV.

La radiación infrarroja es la que produce la sensación de calor, sin embargo cuando esta radiación es neutralizada por las condiciones antes mencionadas, la población cree que no está sometándose a ningún tipo de radiación debido a que no percibe esta sensación de calor, y en realidad la radiación que están recibiendo es UV, la más perjudicial para la salud.

Otro factor a considerar es la reflexión del suelo, ya que las superficies de suelo calizo y nieve, pueden reflejar entre el 20% y 30% de las radiaciones UV que llegan a tener contacto con estas superficies (CONIDA 2008).

### **1.7 Efecto de la radiación UV en los seres humanos**

De acuerdo a la profundidad de penetración, los efectos se manifiestan en la piel y ojos, en donde la radiación es absorbida por la córnea y el cristalino antes de llegar a la retina. Los efectos que aparecen en la piel pueden ser agudos y crónicos, de entre los agudos se puede mencionar las quemaduras, bronceado y producción de vitamina E, estos aparecen rápidamente y son de corta duración.

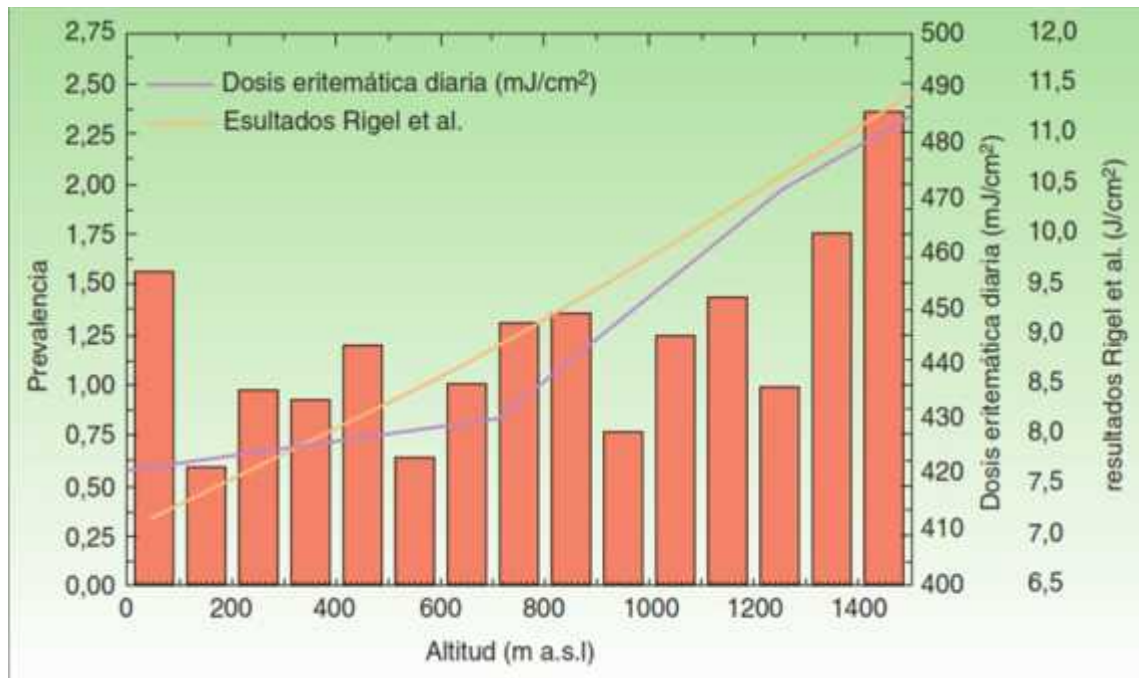
Los crónicos son aquellos que se desarrollan lentamente y de forma gradual y son de duración larga, estos son el cáncer de piel y el envejecimiento prematuro, debido a extensas exposiciones solares. El enrojecimiento o eritema en la piel se produce por el aumento de la circulación y la dilatación de los capilares de la dermis, producido por la exposición a la radiación UV (CONIDA 2008).

### **1.8 Relación altitud – radiación UV – melanoma**

Los datos muestran una mayor incidencia de melanoma en la zona ecuatorial de Europa, precisamente en Austria y Suiza, en donde la altitud de ambos países son semejantes, lo que deriva en la hipótesis de que la altitud es directamente proporcional a la dosis eritemática recibida, debido a que la radiación solar tiene un menor recorrido hasta dichas zonas de altitud,

y por ende, al pasar durante un corto tiempo a través de la atmósfera, no puede ser eliminada (absorción y dispersión) por lo componentes atmosféricos.

Basados en esta hipótesis, se realizó un estudio en Granada, provincia española, y se determinó que, en efecto, la dosis eritemática recibida es directamente proporcional a la altitud, volviéndose exponencial a partir de los 700 m s.n.m., y desde esta misma altitud, se intensifica la prevalencia de melanoma, observándose la prevalencia más alta entre los 1400 y los 1500 m s.n.m. (Aceituno-Madera et al. 2011).



**Gráfico 1-1** Prevalencia de melanoma a intervalos de 100 metros y dosis eritemática diaria en función de la altitud en la provincia de Granada.

Fuente: (Aceituno-Madera et al. 2011)

Una vez identificada la relación existente entre la altitud – radiación UV – melanoma, ésta puede ser aplicada en nuestro país, ya que el mismo posee zonas de mayor altitud que aquellas en donde se realizó el estudio, además de esto, también se encuentra en la zona ecuatorial del planeta, en donde además de los factores antes mencionados, hay que decir que la radiación solar cae de manera perpendicular en la superficie terrestre por lo que llega de forma más directa y con toda su intensidad.

También las zonas de mayor altitud en donde existen núcleos poblacionales en la región sierra de nuestro país, sobrepasan fácilmente los 2000 m s.n.m., incluso sobrepasan en algunos casos los 3000 m s.n.m., por lo que hay que tomar en cuenta que a medida que se asciende 1000 metros, la intensidad de la radiación aumenta en un 5%, (Aceituno-Madera et al. 2011).

## **1.9 Dosis Eritemática Mínima**

Se define la DEM (Dosis Eritemática Mínima) como la mínima irradiación necesaria para producir enrojecimiento en la piel, tras un determinado tiempo de exposición a la radiación. A pesar de que el enrojecimiento se produce antes en personas con escasa pigmentación en la piel que en otras con piel más oscura (o sea, depende del fototipo de piel del individuo), se toma como unidad de referencia individuos con piel blanca ligeramente pigmentada (Calle 1998).

## **1.10 Fotoprotección**

La fotoprotección agrupa los distintos métodos capaces de contrarrestar los daños cutáneos provocados por las radiaciones solares. Los mecanismos fisiológicos de la fotoprotección natural responden a este objetivo, pero no bastan para proteger una piel normal muy expuesta o una piel anormalmente fotosensible. Por lo tanto, en estos casos se requiere una fotoprotección artificial externa o interna (Amblard 2001).

## **1.11 Fotoprotección Natural**

### ***1.11.1 Barrera cutánea***

El papel protector de la barrera cutánea se demuestra por la falta de insolación en las regiones palmares y plantares, naturalmente hiperqueratósicas, y el descenso de la DEM después de abrasión de la capa córnea. Esta fotoprotección se relaciona con las capacidades de reflexión, de difracción y de absorción fotónica de la queratina.

La radiación luminosa, después de una fase de inhibición inicial, desencadena epidermopoyesis, cuya consecuencia es una hiperqueratosis que aumenta la eficacia fotoprotectora del estrato córneo (Amblard 2001).

### ***1.11.2 Sistema pigmentario***

La actividad fotoprotectora se ejerce por absorción de fotones, difracción del rayo incidente y absorción de radicales libres. Esta actividad es estimulada por la exposición solar. Sus propiedades son máximas con respecto a la eumelanina y menor para la feomelanina, que se comportaría como un fotosensibilizador agresivo para las células (Amblard 2001).

### ***1.11.3 Pilosidad***

Tiene una función protectora muy importante, que se basa en los mismos mecanismos de acción de la queratina, antes mencionados (Amblard 2001).

### ***1.11.4 Pigmentos carotenoides***

Su rango de absorción va desde 450 hasta 700 nm, por lo que su acción es nula frente a los rayos UV, sin embargo actúan como antirradicales (Amblard 2001).

### ***1.11.5 Enzimas antioxidantes***

Las células presentan una serie de sistemas de defensa antirradicales, los cuales complementan la función fotoprotectora de la melanina y queratina cutáneas, entre estos tenemos: superóxido dismutasa, peroxidasa, glutatión (Amblard 2001).

### ***1.11.6 Sistemas de reparación del ADN***

Son los mecanismos de última línea que reparan los daños del material genético provocados por los fotones que escaparon a los medios de fotoprotección precedentes. Existen varios: sistemas



de fotorreactivación, de escisión-reparación, reparación posreplicativa y sistema SOS. La eficacia de la fotoprotección natural de una persona depende básicamente de su pigmentación constitucional y de la capacidad para aumentarla después de la exposición solar.

El fototipo determina la fotosensibilidad individual. Existen numerosos parámetros para la apreciación del fototipo, el más pertinente es la coloración de la piel (Amblard 2001).

## **1.12 Fotoprotección externa**

Pantallas y filtros solares:

Son sustancias que actúan dispersando o absorbiendo la radiación UV impidiendo que llegue a la piel, prolongan el tiempo de fotoprotección natural (Amblard 2001).

### **1.12.1 *Pantallas***

Son sustancias particulares en forma de polvo. El dióxido de titanio y el óxido de zinc son los productos más empleados en la actualidad. Actúan desviando y dispersando la radiación, en teoría sin diferenciar la longitud de onda. En realidad, la síntesis de partículas muy finas (de 0,02 a 0,01  $\mu\text{m}$ ) ha permitido desplazar el espectro de acción hacia las longitudes de onda más cortas (UVB-UVA), dando a esas moléculas un aspecto transparente muy interesante desde el punto de vista cosmético.

Su concentración no es limitada, lo cual permite conseguir, asociados entre sí y eventualmente a filtros químicos, fotoprotectores externos de alto coeficiente (Amblard 2001).

### **1.12.2 *Filtros***

Son moléculas sintéticas que actúan por absorción fotónica selectiva según la longitud de onda. Hay filtros de espectro reducido selectivos para los UVB (benzimidazoles, benzidileno alcanfor, cinamatos, PABA) y filtros llamados «de amplio espectro», eficaces, al menos parcialmente, contra los UVB y los UVA (benzofenona, dibenzoilmetano, mexoril SX y XL, octocrileno).

Como la concentración máxima en el producto terminado en muchos países está limitada por la legislación, a menudo es preciso asociar varios filtros para cubrir una banda suficientemente amplia y lograr un poder de protección importante (Amblard 2001).

### **1.12.3 Trampas de radicales libres**

Son moléculas que neutralizan los radicales libres, y por ende presentan acción antioxidante como: vitaminas A, C, E, oligoelementos (selenio, zinc, manganeso, etc), carotenoides, flavonoides (Amblard 2001).

## **1.13 Filtros químicos u orgánicos**

Las sustancias más recientemente incorporadas a este grupo han sido los Mexoryl y los Tinosorb, ya presentes en los fotoprotectores que utilizamos desde hace unos años. El ácido sulfónico dialcanfor tereftalilideno (Mexoryl SX) y el trisiloxano drometrizol (Mexoryl XL), desarrollados por L'Oreal absorben radiación UVB y UVA. A este respecto, la aplicación diaria de una fórmula con Mexoryl SX en humanos ha demostrado absorber la radiación UV, previniendo el daño en la piel inducido tanto por la radiación UVB como UVA.

En cuanto al metilen-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (Tinosorb M) y el bis-etiltexiloxifenol metoxifenil triazena (Tinosorb S) absorben y reflejan fotones. Las últimas tendencias en desarrollo de fotoprotectores orgánicos son las sustancias que absorben fotones vehiculizadas en microcápsulas de glass sol-gel, hechas de una envoltura de sílice de 1 µm de diámetro. Esto reduce la penetración del filtro UV en la piel, mejorando su fotoestabilidad y disminuyendo su potencial alergénico.

Considerando el papel que los radicales libres generados durante la exposición solar tienen en el daño actínico, una de las vías para aumentar la eficacia fotoprotectora de los filtros solares es modificarlos, añadiéndoles ingredientes con capacidad antioxidante. En esto consiste una novedosa combinación de una sustancia que absorbe fotones de radiación UVB, como es el octil-metoxicinamato (OMC), y el antioxidante nitroxido de piperidina (OC-NO, Tempols).

Este nuevo fotoprotector absorbe fotones de radiación UVB y UVA, atrapa los radicales libres y reduce la peroxidación lipídica. Incluso se ha estudiado su poder fotoprotector combinado con 2

filtros UVA, la avobenzona y el dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), con excelentes resultados. Por todo ello, la combinación OC-NO y DHHB constituye un filtro de amplio espectro fotoestable y que además reduce el daño inducido por los radicales libres generados por la radiación UV.

El uso de sustancias como éstas, es decir con ingredientes “multi-activos” en las fórmulas fotoprotectoras, permitirá reducir el número de ingredientes de las mismas manteniendo o incluso aumentado su efectividad. El perfil de seguridad de los filtros químicos sigue siendo un tema en investigación. Un estudio realizado en voluntarios sanos aplicaban diariamente en todo su superficie corporal (2mg/cm<sup>2</sup>) un fotoprotector (w/w) que contenía benzofenona-3 (BP-3), OMC y 3-(4-metilbenzilideno) alcanfor (4-MBC).

Sorprendentemente, las concentraciones medias en plasma fueron más altas a las 96 h que a las 24 h para 4-MBC y OMC en hombres y para BP-3 y 4-MBC en mujeres. No obstante, la realidad es que la cantidad de fotoprotector que nos aplicamos es alrededor de un 50% de la utilizada en este estudio y que, aunque estas sustancias poseen efectos deletéreos, estos no han sido demostrados en condiciones habituales de uso.

Recientemente han aparecido los denominados fotoprotectores no-permeables (NPSUN). Sus características químicas hacen que permanezcan confinados a la superficie del estrato córneo donde actúan las moléculas fotoprotectoras, impidiendo que la radiación solar alcance la dermis ni el fotoprotector al torrente circulatorio (Gilaberte y González 2010).

#### **1.14 Agentes antioxidantes**

La radiación UV causa daño en el ADN, oxidación de las proteínas e induce la síntesis de metaloproteinasas (MMP). La fotoprotección mediante el uso de antioxidantes vegetales para lograr proteger la piel humana frente al daño inducido por la radiación UV ha ido adquiriendo un interés creciente en la investigación en fotoprotección en los últimos años. Su capacidad antioxidante disminuye el daño inducido por la radiación UV sin interferir con la síntesis de vitamina D en la piel.

Pero además, muchas de estas sustancias naturales han demostrado poseer propiedades fotoprotectoras no basadas exclusivamente en su efecto antioxidante. Los antioxidantes clásicos contenidos en las fórmulas de fotoprotectores incluyen la vitamina C, vitamina E y el b-caroteno. A continuación, se resumen los fotoquímicos que en los últimos años han demostrado tener efecto fotoprotector (Gilaberte y González 2010).

### **1.14.1 Carotenoides**

Los principales representantes de los carotenoides son astaxantina y luteína, estos derivados de la xantofila se caracterizan por eliminar los radiales peroxilipídicos, disminuyendo así la acumulación de poliaminas libres, inducidas por la radiación (Gilaberte y González 2010).

### **1.14.2 Polifenoles**

Son sustancias encontradas en las plantas, las cuales se caracterizan por mostrar un grupo fenólico por cada molécula, estos se encuentran subdivididos en taninos hidrolizables y en fenilpropanoides, dentro de estos últimos encontramos a los flavonoides (Gilaberte y González 2010).

#### **1.14.2.1 Flavonoides**

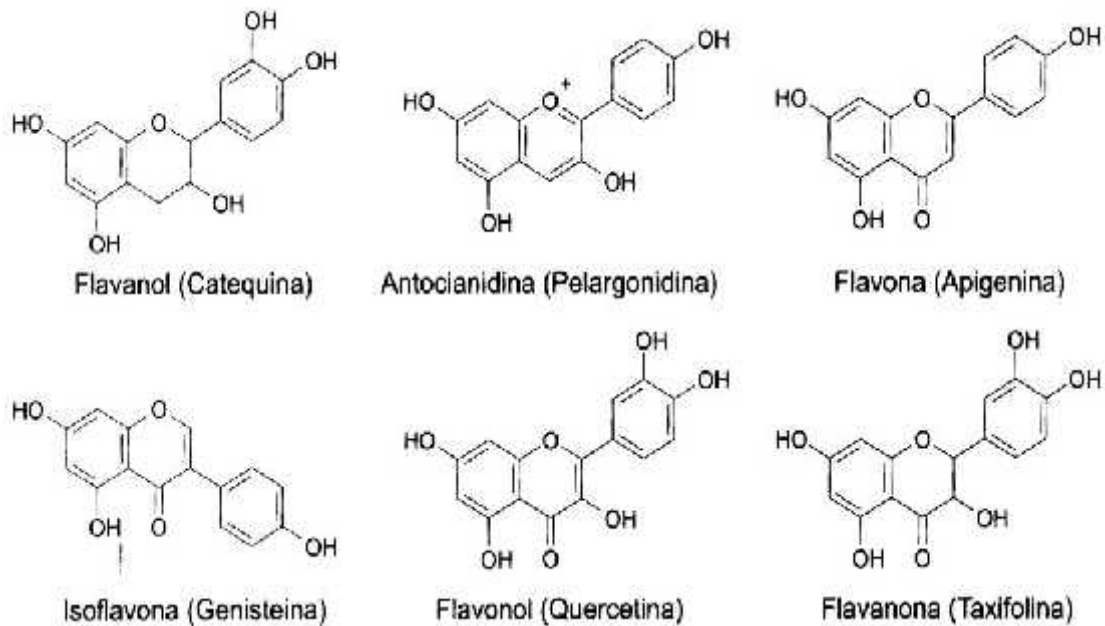
Flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas o la polución ambiental, entre otros. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras, así como en diversas bebidas, y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.

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 en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en: 1) flavanos, como la catequina; 2) flavonoles, representados por la quercetina; 3) flavonas, como la diosmetina, y 4) antocianidinas. En cuanto a sus efectos fotoprotectores, los flavonoides de un lado absorben la radiación UV, de otro poseen actividad antioxidante directa e indirecta y, por último, modulan

diversas vías de señalización. Se han identificado más de 5.000 flavonoides, entre los cuales pasamos a describir aquellos en los que se ha demostrado algún efecto fotoprotector.

De entre todos estos compuestos, cabe recalcar que la quercetina es el flavonoide con la actividad antioxidante más potente, sin embargo no existen muchos estudios de fotoprotección con este flavonoide, pero algunas formulaciones tópicas aplicadas a animales, han demostrado que disminuyen el daño causado por la radiación UVB (Gilaberte y González 2010).



**Gráfico 2-1** Estructuras de los principales grupos de flavonoides  
Fuente: (Farfán, Oliva y Jayes 2012)

### 1.15 Evolución de los flavonoides

La teoría de que las primeras plantas en el planeta fueron las algas, de las cuales se derivaron las demás especies terrestres ha sido aceptada por muchos grupos científicos, concordando con esta afirmación.

Por ende, se cree que los flavonoides aparecieron desde que las plantas empezaron a colonizar los continentes, debido a que surgieron como una protección contra la radiación ultravioleta, esto se piensa ya que los flavonoides no se encuentran en la composición de las algas. Y para explicarlo existen dos posibles teorías de evolución de los flavonoides: surgen como pantallas como la radiación UV o como reguladores de hormonas de las plantas.

La primera hipótesis se basa en el hecho de que flavonoides simples como las chalconas, auronas y flavononas, muestran una fuerte absorción de longitudes de radiación ultravioleta, mientras que algunas variaciones de plantas que no presentan estos compuestos, son sensibles a daños por exposición a la radiación UV.

La segunda, se fundamenta en que los flavonoides regulan el transporte de auxina en las angiospermas, además de esto se presume que las enzimas de los primeros flavonoides no eran tan eficientes como los actuales, por lo que no podían aglomerarse en la cantidad necesaria para proteger a la planta (Farfán, Oliva y Jayes 2012).

### **1.16 Mecanismos de acción de los flavonoides sobre la radiación UV**

Los flavonoides pueden actuar de dos formas, la primera, absorbiendo la radiación mediante las células epidérmicas de la planta, sin interferir en la absorción de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y la segunda es la propiedad de captación de radicales libres por parte de los flavonoides O-di-hidroxisustituídos, como la quercetina y la luteolina. Dicho esto se puede decir que los flavonoides pueden presentar una protección doble frente a la radiación UV.

Además cabe recalcar que las plantas pueden desarrollar otros sistemas de fotoprotección los mismos que pueden actuar en conjunto con los flavonoides, uno de estos mecanismos es la acumulación de ceras en la cutícula, o la inclinación de las hojas para evitar la penetración directa de la radiación (Mejía-Giraldo, Atehortúa y Puertas-Mejía 2014).

### **1.17 Fototipo de piel**

El fototipo de piel es la adaptación que tiene cada persona al sol desde que nace, por lo tanto es el conjunto de características que determinan que la piel se broncee o no, cómo y en qué grado. Mientras más baja sea esta capacidad, menos se contrarrestarán los efectos producidos por la radiación solar en la piel.

Para poder determinar el fototipo de piel, se debe observar el color de la misma en las partes que no han sido expuestas al sol, o han sido expuestas mínimamente, es decir, la parte posterior de las rodillas, la parte interior del antebrazo, parte inferior de las piernas (justo por encima de los

tobillos). No se deben utilizar las zonas que han sido expuestas al sol ya que su color ha sido alterado debido a una repetida y prolongada exposición a la radiación solar.

Otros factores tomados en cuenta se describen a continuación (Marín y Del Pozo 2005):

- Aparición de pecas en verano.
- Color epidérmico en invierno: lechoso o blanco.
- Brillo: mate o ligeramente opaco.
- Color adquirido al broncearse: dorado, dorado-moreno, moreno (en sus diferentes tonalidades).
- Aparición de eritema (enrojecimiento) ante una exposición inmediata al sol (menos de 10 min).
- Presencia de eritema a los 21 días de exposición. Para determinar el grado de activación de los mecanismos fotoprotectores de la piel (formación de pigmento y engrosamiento del estrato córneo, que requieren 2-4 semanas para desarrollarse).
- Historia genética.
- Edad.
- Número de quemaduras solares graves que se ha tenido previamente.
- Posibilidad de fotosensibilización por determinados alimentos, medicamentos y cosméticos, entre otros posibles agentes causales.

**Tabla 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

\*Las fotografías de los diferentes fototipos pueden consultarse en el sitio web: [www.uv.es/~vicalagr/CLindex/CLcancer/CLprecan11.htm](http://www.uv.es/~vicalagr/CLindex/CLcancer/CLprecan11.htm)

### Gráfico 3-1 Fototipos cutáneos

Fuente: (Marín y Del Pozo 2005)

**Tabla 2. Test de evaluación del fototipo\***

<p>1. ¿Cuál es el color natural de su piel cuando no está bronceada?</p> <input type="checkbox"/> 0 Rojiza, blanca <input type="checkbox"/> 2 Blanca-beige <input type="checkbox"/> 4 Beige <input type="checkbox"/> 8 Marrón clara <input type="checkbox"/> 12 Marrón <input type="checkbox"/> 16 Negra	<p>4. ¿Cuántas pecas tiene de manera natural en el cuerpo cuando no está bronceado?</p> <input type="checkbox"/> 0 Muchas <input type="checkbox"/> 4 Algunas <input type="checkbox"/> 6 Unas cuantas <input type="checkbox"/> 8 Ninguna	<p>6. ¿Qué categoría describe mejor su potencial de quemadura después de exponerse al sol una hora en verano?</p> <input type="checkbox"/> 0 Siempre se quema y no se broncea nunca <input type="checkbox"/> 2 Habitualmente se quema, pero puede broncearse ligeramente <input type="checkbox"/> 4 Se quema ocasionalmente, pero se broncea moderadamente <input type="checkbox"/> 8 Nunca se quema y se broncea con facilidad <input type="checkbox"/> 10 Raramente se quema y se broncea profundamente <input type="checkbox"/> 12 Nunca se quema
<p>2. ¿De qué color natural es su pelo?</p> <input type="checkbox"/> 0 Pelirrojo, rubio claro <input type="checkbox"/> 2 Rubio, castaño claro <input type="checkbox"/> 4 Castaño <input type="checkbox"/> 8 Castaño oscuro <input type="checkbox"/> 12 Castaño oscuro-negro <input type="checkbox"/> 16 Negro	<p>5. ¿Qué categoría describe mejor su herencia genética?</p> <input type="checkbox"/> 0 Raza blanca de piel muy blanca <input type="checkbox"/> 2 Raza blanca de piel clara <input type="checkbox"/> 4 Raza blanca piel morena (Mediterráneo) <input type="checkbox"/> 8 Oriente Medio, hindú, asiático, hispano-americano <input type="checkbox"/> 12 Aborigen, africano, afroamericano	<p>7. ¿Qué categoría describe mejor su potencial de bronceado?</p> <input type="checkbox"/> 0 Nunca se broncea <input type="checkbox"/> 2 Se puede broncear ligeramente <input type="checkbox"/> 4 Se puede broncear moderadamente <input type="checkbox"/> 8 Se puede broncear profundamente

A continuación, sume los puntos de las 7 respuestas e identifique su puntuación total con el tipo de piel correcto que se enumera más abajo.  
 PUNTUACIÓN TOTAL: \_\_\_\_\_ TIPO DE: \_\_\_\_\_

**Gráfico 4-1** Test de evaluación para determinar el fototipo cutáneo.

Fuente: (Marín y Del Pozo 2005)

**Tabla 3. Puntuación del tipo de piel y descripción**

0-7	Fototipo I	Muy sensible a la luz solar
8-21	Fototipo II	Sensible a la luz solar
22-42	Fototipo III	Sensibilidad normal a la luz solar
43-68	Fototipo IV	La piel tiene tolerancia a la luz solar
69-84	Fototipo V	La piel es oscura y su tolerancia es alta
+85	Fototipo VI	La piel es negra y su tolerancia es altísima

**Gráfico 5-1** Fototipo de piel clasificado de acuerdo a sus características

Fuente: (Marín y Del Pozo 2005)

### 1.18 Plantas C4

Existen 3 tipos de fotosíntesis:

- Fijación del carbono C3
- Fijación del carbono C4
- Fotosíntesis CAM



Las plantas C3 realizan la fijación de CO<sub>2</sub> de forma directa, mientras que las plantas C4 realizan la fijación de CO<sub>2</sub> mediante la adaptación del mismo a otros compuestos, de esta manera mejoran la eficiencia del uso de agua, lo que les permite adaptarse de mejor manera a condiciones de luz solar intensa, y de sequía.

Aquí el primer producto fotosintético contiene 4 carbonos: el ácido oxalacético y sus sales. Las plantas se han adaptado lentamente a la naturaleza en los climas áridos y cálidos. Han desarrollado una estrategia para optimizar la capacidad de asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico, e incorporarlo a la planta. Para ello modificaron convenientemente su genoma.

Al cultivar en un mismo ambiente, a 30 °C hierbas C3 y hierbas C4, se observa que mientras las hierbas C3 pierden aproximadamente 833 moléculas de agua por cada molécula de CO<sub>2</sub> fijado, las yerbas C4 pierden solamente 277 moléculas de agua por molécula de CO<sub>2</sub> fijada. Las plantas C4 usan el agua más eficientemente, conservan la humedad del suelo, y colonizaron las tierras áridas.

Las C4 aparecieron durante el Oligoceno, hace 25-32 millones de años, luego durante el Mioceno, hace 6-7 millones de años, se convirtieron en un grupo ecológico importante.

La enzima que usan es la PEP carboxilasa (fosfoenolpiruvato carboxilasa), que convierte el fosfoenolpiruvato (compuesto de 3 carbonos) en oxalacetato (compuesto de 4 carbonos). A partir del oxalacetato se produce malato, es una enzima activada por la luz. Se encuentra en los cloroplastos de las Plantas C4. El malato incorpora a la planta el carbono de la fotosíntesis. Es un procedimiento indirecto, diferente del de las plantas C3.

En las C4 hay dos clases de cloroplastos: unos se hallan en las células internas, contiguos a los vasos conductores de las hojas, y los otros están en las células del parénquima clorofílico periférico, el mesófilo. En este último tipo de cloroplasto se produce la fijación del CO<sub>2</sub>. Las plantas C3 solo tienen un cloroplasto. Es la gran diferencia con las C4. Para lograr los dos cloroplastos en la planta, hay que introducir un gen en el lugar apropiado del genoma.

Se conocen algunas pocas especies que funcionan con un proceso C4 limitado, por ej.: Suaeda aralocaspica, y otras especies que habitan zonas áridas, salinas, en Asia. Estas excepciones pueden hacer más fácil la conversión de C3 en C4. Es un problema de ingeniería genética. La molécula aceptora es el ácido fosfoenolpirúvico, y la enzima que actúa es la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

A Partir del ácido fosfoenolpirúvico y del CO<sub>2</sub> se genera el ácido oxalacético. Este ácido se transforma en málico, el cual pasa a los cloroplastos propios de las células internas. En éstos se libera el CO<sub>2</sub>, y continúa el ciclo de Calvin, como en las plantas C3.

Pertencen al grupo C4 el maíz, la caña de azúcar, la mala hierba grama (*Cynodon dactylon*), el sorgo y el amaranto (Bolufer 2010).

## **1.19**      *Chenopodium murale*

### **1.19.1**    *Taxonomía*

Nombre Científico	<i>Chenopodium murale</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Género	Chenopodium
Epíteto Específico	Murale

Fuente: (National Park Service 2012)

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016

### **1.19.2**    *Ficha Técnica*

#### **Introducción**

Este quenopodio exótico crece en lugares con suelos alcalinos y fértiles.

#### **Nombres**

##### ***Otros nombres comunes usados en español***

Hediondilla, quinoa negra, yuyo negro, quelite de perro, hierba del perro.

#### **Origen y distribución geográfica**

##### ***Área de origen***

Nativa del Viejo Mundo, ampliamente naturalizada en América.

## ***Estatus migratorio en Ecuador***

Exótica.

## **Identificación y descripción**

### ***Descripción técnica***

*Hábito y forma de vida:* Planta erguida o ascendente.

*Tamaño:* De 10 a 60 cm de alto.

*Tallo:* Profusamente ramificado desde la base, a veces con textura harinosa (farinoso).

*Hojas:* Con pecíolos delgados, ovadas o rómbico-ovadas, de 2 a 7 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho, irregularmente sinuado-dentadas, con textura harinosa en el envés, sobre todo cuando tiernas.

*Inflorescencia:* En forma de pequeños glomérulos, de cimas o panículas axilares o terminales, mas bien cortas.

*Flores:* Pentámeras, diminutas; perianto de 1 mm de largo, lobulado, los lóbulos harinosos, envolviendo el fruto de manera incompleta.

*Frutos y semillas:* Fruto (un utrículo) envuelto incompletamente por el perianto; pericarpio adherente a la semilla; semilla horizontal, finamente punteada, biconvexa, de 1.5 mm de diámetro, con el borde agudo o atenuado (formando un ángulo menor de 45°).

*Plántulas:* Hipocótilo cilíndrico, de 5 a 17 mm, con pelos; cotiledones de lámina oblongo-lanceolada a lanceolada, de 3.5 a 10 mm de largo y 1 a 3 mm de ancho, sin pelos; epicótilo nulo o cilíndrico; hojas opuestas.

## **Hábitat**

### ***Hábitat***

Arvense y ruderal.

### ***Distribución altitudinal***

En el Valle de México se conoce hasta los 3000 m.

### ***Distribución por tipo de suelos***

Suelos fértiles o salitrosos, ricos en materia orgánica o nitrógeno nítrico.

## **Biología y ecología**

### ***Propagación, dispersión y germinación***

Se propaga por semilla.

### ***Ciclo de vida***

Planta anual.

### ***Fenología***

Florece desde mediados de verano a mediados de otoño, fructifica desde principios de otoño. En cultivos anuales se encuentra principalmente entre marzo y diciembre, pero en cultivos de más permanencia, como alfalfa o en jardines, se le encuentra todo el año en diferentes fases fenológicas.

## **Impacto e importancia**

### ***Cultivos afectados y efectos sobre los cultivos***

Villaseñor y Espinosa (1998) mencionan que se encuentra en ajo, ajonjolí, alfalfa, algodón, avena, caña, cártamo, cebada, cítricos, frijol, garbanzo, haba, linaza, maíz, nopal, papa, sorgo, soya, tomate, uva.

### ***Usos***

Se utiliza como alimento para ganado.

### ***Impacto económico y social***

En Argentina fue declarada “plaga de la agricultura” y su lucha es obligatoria.

### ***Estatus de naturalización de exóticas***

Naturalizado.

## **Control**

### ***Resistencia a herbicidas***

Susceptible a 2,4-D y Picloram (Mondragón y Vibrans 2009).

### **1.20 Muerte Celular Inducida**

La muerte celular inducida, como su nombre lo indica es la lisis celular provocada, por diversos factores externos o internos, incluso puede ser un mecanismo normal de homeostasis en algunos organismos, como por ejemplo cuando una infección ya ha sido controlada y eliminada, las células que contribuyeron para neutralizar la infección, inducen su muerte para eliminar el excedente de células en el organismo (Medrán 2008).

Como se dijo anteriormente existen factores o estímulos externos que inducen muerte celular, uno de estos factores es la radiación UVB, la misma que causa daño y posteriormente lisis celular, por lo que se utilizará para determinar la capacidad fotoprotectora de los extractos, como se explica en el Marco Metodológico.

### **1.21 Estándar Mcfarland**

El estándar Mcfarland se utiliza como patrón de referencia en la preparación de suspensiones bacterinas. En las pruebas de sensibilidad antimicrobianas, cuando se requiere preparar inóculos bacterianos, es muy utilizado el patrón de Mcfarland 0.5.

El primer uso que tuvieron estos patrones de turbidez, fue en la preparación de vacunas. En 1907, Mcfarland, preparó una serie de soluciones de sulfato de bario, con turbidez diferente, para determinar el número aproximado de bacterias en soluciones de turbidez semejante, esto se comprobó posteriormente mediante un recuento en placa.

Para conservar los tubos, deben ser guardados en un lugar oscuro a temperatura ambiente (2 - 25°C), se debe evitar sobrecalentamiento y la congelación, antes de utilizarlos hay que asegurarse que estén a temperatura ambiente. Si se observa muestras de que el patrón se encuentra contaminado por microorganismos no debe ser utilizado (Becton 2005).

### **1.22 *Escherichia coli***

Clasificación Científica	
Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria

Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Escherichia
Epíteto Específico	coli

**Fuente:** (Ramírez, Rojas y General 2010)

**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo de características móviles, por lo que posee flagelos peritricos, miden alrededor de 0.5 micras de ancho por 3 micras de largo. Son microorganismos que reducen nitratos a nitritos y producen vitamina B y K (Ramírez, Rojas y General 2010).

Pertenecen al grupo de bacterias que se encuentran localizadas en el intestino de humanos y animales, sin embargo algunas cepas de *E. coli* producen toxinas que causan graves cuadros gastrointestinales en el ser humano (Elika 2013).

### 1.23 Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía en capa fina es un procedimiento analítico sencillo que permite determinar la pureza de un compuesto, comparar dos o más compuestos, realizar el seguimiento de una reacción.

El principio de este procedimiento es el siguiente, una placa de aluminio o plástico donde se encuentra distribuida la fase móvil, caracterizada por ser adsorbente, se coloca la muestra a ser analizada, se coloca en el interior de una cuba cromatográfica en donde se encuentra la fase móvil o eluyente, que se caracteriza por ser una mezcla de disolventes, los mismos que por capilaridad avanzan a través del adsorbente, provocando una repartición diferencial a lo largo de la placa cromatográfica.

La relación existente entre la distancia recorrida por la muestra y la fase móvil, desde el origen de la placa se denomina  $R_f$ , y tiene un valor constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas determinadas.

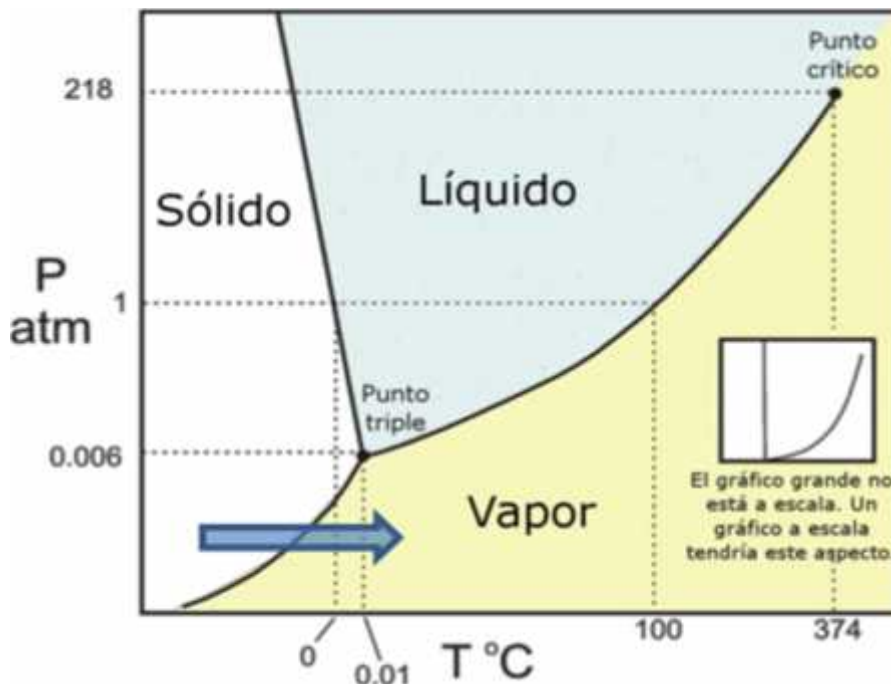
Para determinar el  $R_f$  se aplica la siguiente expresión:

$$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}$$

La distancia recorrida por la muestra, compuesto o soluto debe ser medida desde el centro de la mancha que fue colocada en el origen de la placa (UNAM 2015).

## 1.24 Liofilización

La liofilización, o criodesecación, es un mecanismo por el cual se elimina el hielo de un producto congelado mediante sublimación, es decir se elimina el contenido de agua que se encuentra en estado sólido, convirtiéndose en vapor de agua (estado gaseoso) sin pasar por el estado líquido. Para ello se debe cumplir con condiciones que se encuentren por debajo del punto triple del agua,  $0.01^{\circ}\text{C}$  y  $4.5\text{ mmHg}$  (Universidad de Granada 2011).



**Gráfico 6-1** Diagrama de Presión – Temperatura de los estados del agua  
Fuente: (Universidad de Granada 2011)

### 1.24.1 Etapas del proceso:

- Acondicionamiento de la materia prima
- Congelación
- Sublimación
- Ruptura de vacío
- Almacenamiento
- Rehidratación

#### **1.24.2      *Ventajas de la liofilización:***

- Mantiene mejor la estructura y el aspecto original del alimento
- La baja temperatura de trabajo impide la alteración de productos termolábiles
- Al sublimarse el hielo quedan poros que permiten una reconstitución rápida
- Inhibe el deterioro del color y sabor por reacciones químicas y las pérdidas de propiedades fisiológicas
- La humedad residual es baja
- El tiempo de conservación es largo
- La retención de los aromas es muy alta.

#### **1.24.3      *Inconvenientes de la liofilización:***

- Es necesaria una gran inversión de equipamiento, alrededor de tres veces el de otros métodos
- Alto coste energético y elevado tiempo de proceso (entre 4 y 10 h/ciclo secado).



## CAPÍTULO II

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1 Adquisición del permiso para trabajar con la especie vegetal**

Para obtener el permiso para poder utilizar la especie vegetal se llevó la cantidad de gramos que se indica va a utilizarse en la investigación, se presentó la cantidad recolectada en el Ministerio del Ambiente, en donde guardaron evidencia digital de la muestra y procedieron a emitir la guía de movilización y el permiso correspondiente.

#### **2.2 Recolección y acondicionamiento de la muestra vegetal.**

Se recolectaron 2 Kg de la especie *Chenopodium murale* en fundas plásticas oscuras, en la parroquia Ilapo, cantón Guano, provincia de Chimborazo, con las siguientes coordenadas: X = 770746.65 Y = 9826678.20; 3548 msnm. Después de haber sido recolectada la planta, se procedió a separar las hojas de los tallos, ya que éstas son el objeto del presente estudio. Se dejaron secar en un ambiente libre de humedad y en condiciones de oscuridad (libre de luz solar), durante una semana.

Finalmente se realizó la molienda de las hojas secas, para obtener el producto final del cual se realizarán todas las pruebas que se detallan a continuación.

#### **2.3 Control de calidad del material vegetal.**

##### **2.3.1 *Determinación del contenido de humedad***

Es un método gravimétrico se realiza por desecación y para determinar se parte de 2 gramos de material vegetal triturado, se transfiere a una cápsula previamente tarada, posteriormente se

procede a secar en la estufa por 3 horas a 105 °C. Una vez cumplido el tiempo se coloca la cápsula en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa; nuevamente se coloca la cápsula en la estufa por una hora y se repite el procedimiento hasta que el peso sea constante.

Esta determinación se realizó por triplicado y posteriormente se realizaron los cálculos mediante la fórmula (MINSAP 1992):

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100$$

En el que:

M1: Representa la masa de la cápsula vacía.

M2: Representa la masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de secado.

M3: Representa la masa de la cápsula con la muestra desecada.

100: Es un factor matemático para los cálculos

### **2.3.2 Determinación de cenizas totales**

Es un método gravimétrico y para esta determinación se procede a pesar 2 gramos de material vegetal triturado, se transfiere a un crisol de porcelana anteriormente tarado, se coloca en un reverbero para carbonizar la muestra y posteriormente se introduce en un horno mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo se coloca el crisol de porcelana en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; se coloca nuevamente en el horno mufla a 700 °C por media hora y se repite el procedimiento hasta que el peso sea constante.

En caso de que se presente trazas de carbón en el residuo se le añade gotas de peróxido de hidrógeno, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio 10 mg en 100 mL y se procede a evaporar con la finalidad de que el residuo sea casi o de color blanco. Esta determinación se realizó por triplicado y posteriormente se realizaron los cálculos. Según la fórmula establecida por (MINSAP 1992):

$$\%C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

$$\%Ct = \frac{C1}{100 - H} \times 100$$

En el que:

%C1: Representa al porcentaje de cenizas en base hidratada.

M: Representa a la masa del crisol de porcelana vacío.

M1: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra antes del proceso de incineración.

M2: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra incinerada.

%Ct: Representa al porcentaje de cenizas totales en base anhidra.

H: Representa al porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

### 2.3.3 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Es un método gravimétrico en el que para la determinación a las cenizas totales se le añade 20 mL de agua destilada, se procede a tapar el crisol de porcelana y se hace hervir de manera suave por 5 minutos en un reverbero. En un papel filtro totalmente limpio se filtra la solución resultante y se lo coloca al crisol de porcelana inicial, posteriormente se carboniza en un reverbero y se incinera en un horno mufla a 700 °C por 2 horas.

Una vez cumplido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; el proceso se repite en intervalos de media hora hasta alcanzar un peso constante. Esta determinación se realizó por triplicado y luego se realizaron los cálculos utilizando la fórmula establecida por (MINSAP 1992):

$$\%C1 = \frac{M2 - M4}{M1 - M} \times 100$$

$$Ca = \frac{C1}{100 - H} \times 100$$

%C1: Representa al porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada

M: Representa a la masa del crisol de porcelana vacío.

M1: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra antes del proceso de incineración.

M2: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra incinerada.

M4: Representa la masa del crisol de porcelana con las cenizas insolubles en agua.

Ca: Representa las cenizas totales solubles en agua en base anhidra.

H: Representa el porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

#### **2.3.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

Es un método gravimétrico en el que para la determinación a las cenizas totales se le añade 20 mL de ácido clorhídrico al 10%, se procede a tapan el crisol de porcelana y se hace hervir de manera suave por 5 minutos en un reverbero. En un papel filtro totalmente limpio se filtra la solución resultante y se lava con agua destilada caliente hasta que al acidularle con ácido nítrico; al cual se procede añadir 2 gotas de nitrato de plata 0,1 M no presente muestras de cloruros y se lo coloca al crisol de porcelana inicial, posteriormente se carboniza en un reverbero y se incinera en un horno mufla a 700 °C por 2 horas.

Una vez cumplido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; el proceso se repite en intervalos de media hora hasta alcanzar un peso constante. Esta determinación se realizó por triplicado y luego se realizaron los cálculos mediante la fórmula establecida por (MINSAP 1992):

$$\%C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

$$\%Ci = \frac{C1}{100 - H} \times 100$$

En el que:

%C1: Representa el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M: Representa a la masa del crisol de porcelana vacío.

M1: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra antes del proceso de incineración.

M2: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra incinerada.

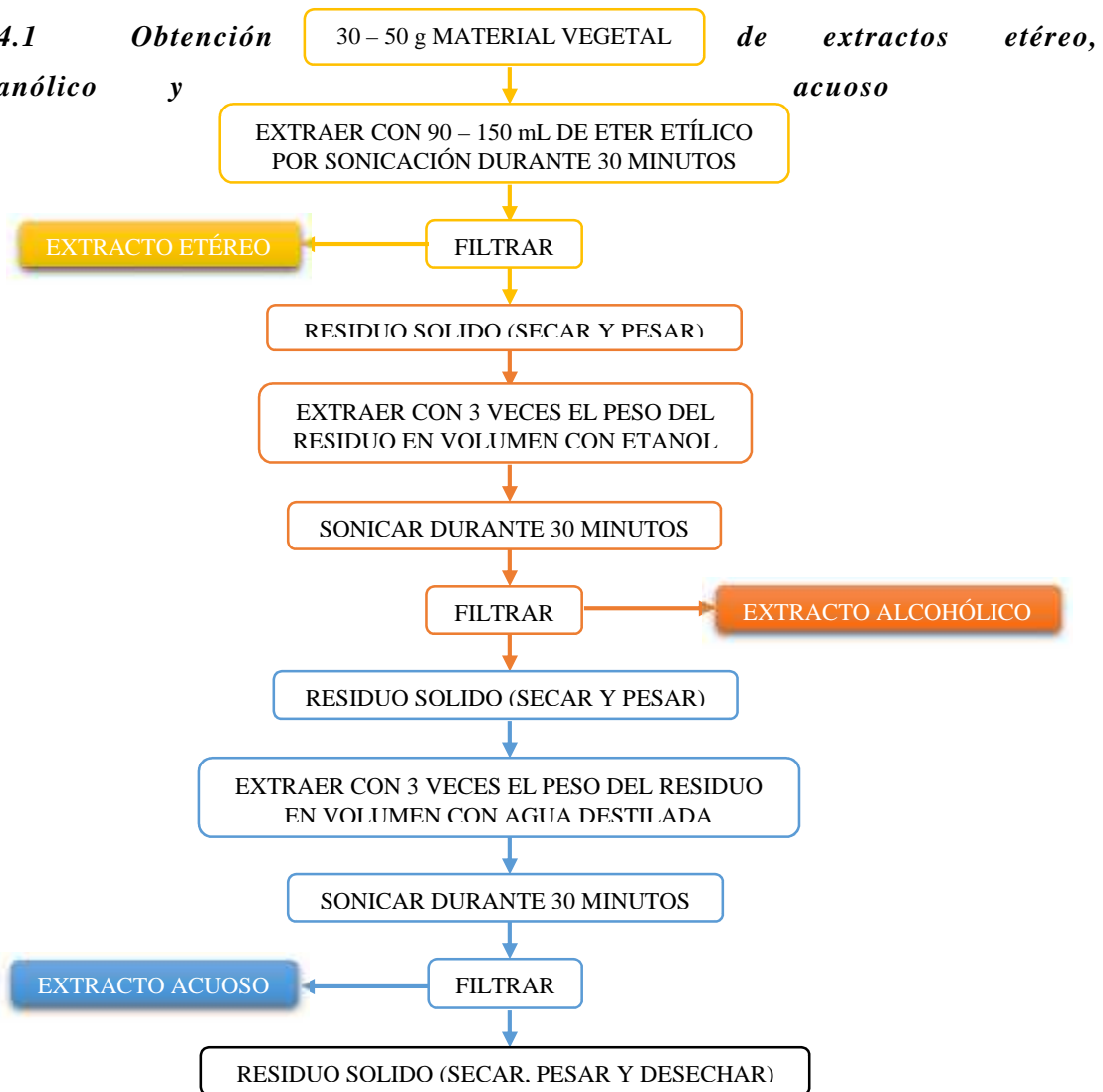
%Ci: Representa las cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base anhidra.

H: Representa el porcentaje de humedad.

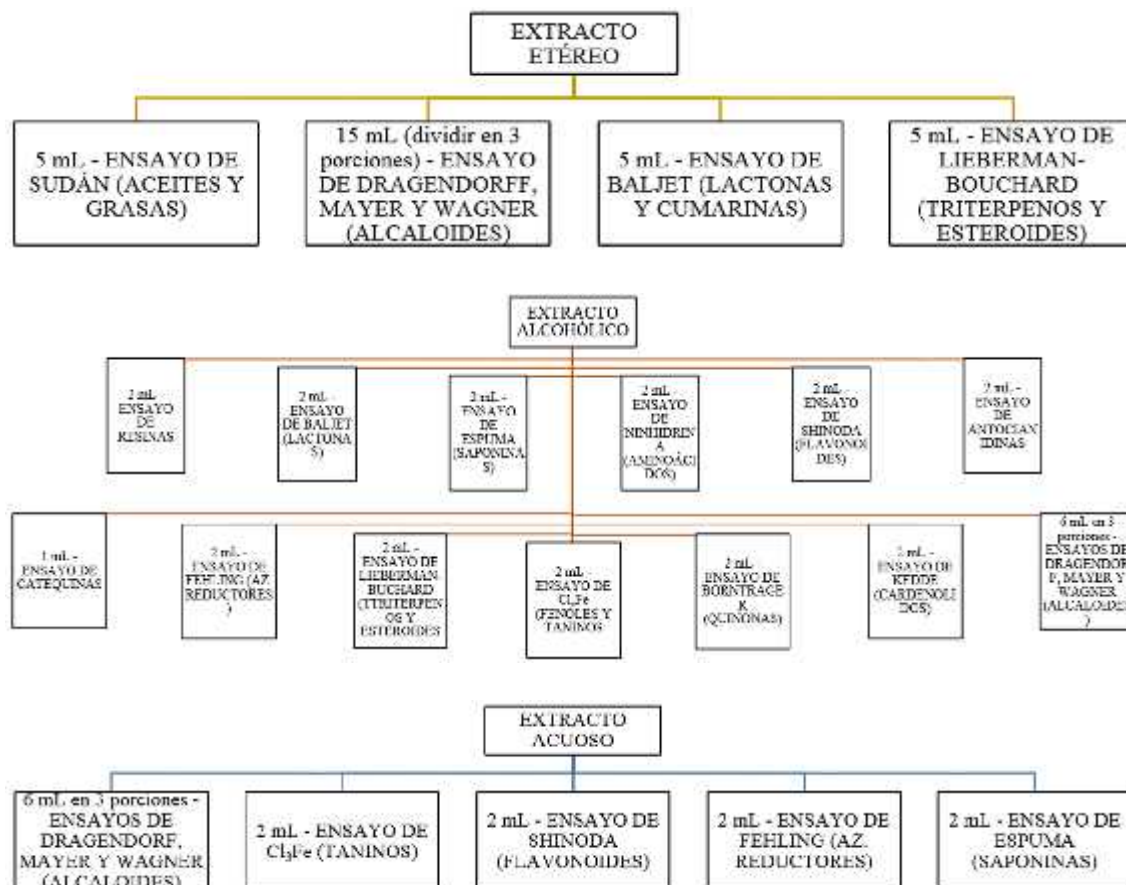
100: Es un factor matemático para los cálculos.

## 2.4 Tamizaje Fitoquímico

### 2.4.1 Obtención de extractos etéreo, etanólico y acuoso



## 2.4.2 Pruebas de Tamizaje



Todas las pruebas mencionadas anteriormente son pruebas rápidas cualitativas, las mismas que ayudan a identificar la presencia de metabolitos primarios y secundarios en el material vegetal.

## 2.5 Obtención del extracto seco de *Chenopodium murale*

Primero se procedió a obtener el extracto alcohólico, del cual se partió hasta obtener el extracto seco. Se utilizaron 50 gramos del material vegetal seco, al cual se añadió etanol al 70%, posteriormente se homogenizó en el vórtex, después se filtró el contenido para eliminar restos

del material vegetal del extracto alcohólico. Posteriormente se procedió a concentrar el extracto mediante un rotavapor (Bûchi R 110), obteniendo así un extracto acuoso.

Después se eliminó el contenido de clorofilas mediante separación de las mismas con solventes orgánicos, mediante un embudo de separación, en el cual se colocaron el extracto acuoso y el solvente orgánico, se agitó y se dejó en reposo hasta la separación de las dos fases. Se repitió varias veces este procedimiento hasta que el solvente orgánico esté libre de clorofilas. Finalmente se realizó el liofilizado del extracto acuoso libre de clorofilas, obteniéndose el extracto en polvo o seco final, con el cual se realizarán el ensayo de fotoprotección, cromatografía, cuantificación de flavonoides y la determinación del factor de protección solar SPF.

## 2.6 Preparación de los subextractos

Se pesaron 50 mg del extracto seco de *Chenopodium murale* y se disolvieron en 25 mL de etanol al 70% obteniendo un subextracto de concentración 2000 ppm (2mg/mL), para la obtención de los subextractos de 200 y 20 ppm, se realizaron diluciones a partir del subextracto de 2000 ppm. La disolución del extracto seco de *Ch. murale* en etanol al 70% se realizó mediante agitación magnética.

## 2.7 Preparación del Estándar McFarland

Las normas de turbidez se preparan mezclando compuestos químicos, cuya reacción da como resultado un precipitado, el mismo que permite dar una turbidez determinada a la solución, una vez explicado esto, la preparación del estándar McFarland consiste en la adición de ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario, como resultado se obtiene sulfato de bario, el mismo que es el precipitado.

El patrón 0,5 de McFarland corresponde a una suspensión homogénea de *Escherichia coli* de  $1,5 \times 10^8$  células por mL (Becton 2005).

Estándar de Turbidez McFarland 0,5	
Reactivo	Volumen
Ácido sulfúrico – 0,18 M	99,5 mL

Cloruro de Bario – 0,048 M	0,5 mL
----------------------------	--------

**Fuente:** (Becton 2005)

**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016

## 2.8 Ensayo de muerte celular inducida

Una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) fue reactivada realizando un cultivo en caldo cerebro – corazón. El extracto seco de *Chenopodium murale* se redisolvió en etanol al 70%, formando subextractos a concentraciones de 20, 200 y 2000 ppm. Cada subextracto fue colocado en un tubo de cuarzo, detrás del mismo fue colocado otro tubo de cuarzo, que contenía una suspensión de *Escherichia coli* (ATCC 25922) 0.5 Mcfarland en solución isotónica de NaCl 0.9%. Ambos tubos formaron una unidad experimental.

Las unidades experimentales fueron irradiadas con una lámpara de UVB de marca Philips, Broadband TL 40w/12RS a una dosis de irradiación de 0,60 J/cm<sup>2</sup>. Se procedió a realizar el conteo de las UFC de las bacterias sobrevivientes a la radiación, para ello se realizó la siembra en agar nutritivo, de 5 µL de la suspensión bacteriana de *E. coli*, después de ser irradiada 7 veces a intervalos de 30 minutos. Este procedimiento se realizó para todos los subextractos preparados y para los controles propuestos en dicha investigación (Avila Acevedo et al. 2005).

## 2.9 Determinación del Factor de Protección Solar (SPF)

Para la determinación del factor de protección solar se preparó una solución alcohólica de 20 ppm, utilizando etanol al 70% como solvente, una vez preparada la solución, se midió su absorbancia por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda, desde 290 nm a 320 nm a intervalos de 5 nm en cada medición. Se utilizó el solvente como blanco en cada medición, y una cubeta de cuarzo de 1 cm.

Para determinar el FPS se aplica la fórmula de Mansur (Dutra et al. 2004):

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



Dónde:

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

## **2.10 Cromatografía en capa fina**

Para realizar la cromatografía en capa fina se utilizó el extracto etanólico de *Chenopodium murale* a 2000 ppm. El mismo que se aplicó en la placa de sílica, la fase móvil que se utilizó fue la siguiente: ACETATO DE ETILO:ÁCIDO ACÉTICO:ÁCIDO FÓRMICO:AGUA (10:1.1:1.1:2.6), la mezcla fue colocada en un embudo de separación hasta saturación, después se desechó la fase acuosa.

La fase móvil se puso en una cuba en donde se colocó la placa de sílica , y se dejó correr la fase. Después de este proceso, se dejó secar la placa. Como revelador se utilizó una solución alcohólica de  $AlCl_3$  al 1% y PEG 400 como potenciador de fluorescencia, la placa se secó y se sometió a calor, para finalmente observar las manchas de los compuestos presentes, en la cámara de UV corto y largo.

## **2.11 Cuantificación de flavonoides totales**

Para la cuantificación de flavonoides totales se aplicó la siguiente metodología:

- a. 10  $\mu$ L del extracto se diluye en 10 mL de metanol.
- b. Tomar 1 mL de la solución metanólica, agregar 300  $\mu$ L de Nitrito de Sodio 5% P/V y 4 mL de agua.
- c. Dejar en reposo 5 minutos.
- d. Agregar a la mezcla 300  $\mu$ L de Cloruro de Aluminio 10% P/V.
- e. Dejar en reposo 6 minutos.
- f. Agregar 2 mL de Hidróxido de Sodio 1M.
- g. Dejar en reposo 5 minutos.

h. Registrar la absorbancia a una longitud de onda igual a 510 nm\*

\*El valor de absorbancia debe ser de aproximadamente 0.06, hacer las diluciones convenientes en a. para lograrlo.

## **2.12 Barrido por Espectrofotometría UV**

Se realizó el barrido del extracto seco de *Ch. murale*, OMC y PAMIDATO utilizando tres solventes, Etanol al 70%, Agua y Cloroformo. Para esto se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se prepararon soluciones a 50 ppm con cada solvente.
2. Se midió la absorbancia en el rango de 200 a 400 nm.
3. Se obtuvieron los datos de absorbancia para ser comparados los posibles picos existentes en cada solución.
4. Como blanco fue utilizado cada solvente.

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Extracto seco

De 48.7328 gramos de hojas secas de *Chenopodium murale*, se obtuvieron 1.389 gramos de extracto seco, obteniendo un rendimiento de 2.85%

#### 3.2 Control de calidad del material vegetal

Los análisis sobre el control de calidad del material vegetal incluyen: humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico. Los resultados de dichos análisis se presentan en la tabla 1-3 que se detalla a continuación.

**Tabla 1-3** Resultados sobre los análisis de control de calidad del material vegetal

Parámetro	Resultado
Humedad	10,8%
Cenizas totales	21.7%
Cenizas solubles en agua	14,1%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	7,6%

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

#### 3.3 Tamizaje Fitoquímico

**Tabla 2-3** Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico del extracto etéreo

Extracto etéreo	
Ensayo	Resultado
Dragendorff	-
Mayer	-
Wagner	-
Baljet	-

Lieberman Buchard	+
-------------------	---

**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.

**Tabla 3-3** Resultados de las pruebas del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico

<b>Extracto alcohólico</b>	
<b>Ensayo</b>	<b>Resultado</b>
Resinas	-
Fehling	-
Espuma	-
Cloruro Férrico	+
Lieberman Buchard	+
Catequinas	-
Saponinas	-
Resinas	+
Shinoda	+
Antocianidinas	-
Baljet	-
Borntrager	-

**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.

**Tabla 4-3** Resultados de las pruebas de tamizaje del extracto acuoso

<b>Extracto acuoso</b>	
<b>Ensayo</b>	<b>Resultado</b>
Shinoda	+
Saponinas	-
Cloruro Férrico	+
Alcaloides	-
Fehling	-
Taninos	-

**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.

Una vez realizado el tamizaje fitoquímico del material vegetal, se pudieron observar resultados positivos para algunos ensayos que se discuten a continuación. Liebermann-Burchard resultó positivo, en los extractos etéreo y alcohólico, lo que muestra la presencia de esteroides, debido a la coloración verde azulada que indica la presencia de dichos compuestos. El ensayo de Resinas resultó positivo en el extracto alcohólico, presentando un precipitado después de haber adicionado agua destilada al extracto.

Y finalmente fueron positivos los ensayos de Cloruro Férrico y Shinoda que indican la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides respectivamente, compuestos de vital importancia para el desarrollo del presente estudio.

Estos resultados se relacionan con el tamizaje realizado por (Guapi 2014) y que se presentan en el Gráfico 7-3, en el cual se expresan los resultados de obtenidos del tamizaje fitoquímico realizado a los granos y hojas de *Chenopodium quinoa* y de Amaranto. Se toman como referencia dichas especies debido a que son familia del género *Cheopodium murale*, ya que todas son pertenecientes de la familia *Amaranthaceae*.

EXTRACTO ALCOHÓLICO														
TIPO DE ENSAYO MUESTRA	CATEGORÍA	QUININAS	ALICARÉS BETULIN ES	LACTONAS Y CORMEANOS	AVICOLINONA	ESTERPENOS ESTERÓIDOS	ESTERES TERPENOS	AMINOS	AMINOS	AMINOS	AMINOS	AMINOS	AMINOS	AMINOS
	ENSAYO DE CATEGORÍA	ENSAYO DE BENTONIT ES	ENSAYO DE FERING	ENSAYO DE BALLEZ	ENSAYO DE ANOCINONAS	ENSAYO DE LIEBERMANN- BUTCHER	ENSAYO DE FAGE	ENSAYO DE LA IMPURA	ENSAYO DE LA MURIBINA	ENSAYO DE BENADA	ENSAYO DE KIDRE	ENSAYO DE BAGENSORT I	ENSAYO DE WILDE	ENSAYO DE RAGNER
GRANO DE QUINUA VARIEDAD BLANCA	++	-	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	-	-	-	-
GRANO DE QUINUA VARIEDAD MORADA	++	-	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	-	-	-	-
GRANO DE QUINUA VARIEDAD FALSA DE VENADO	++	-	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	-	-	-	-
GRANO DE QUINUA VARIEDAD TUCABUANI	++	-	++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	-	-	-	-
HOJA DE QUINUA VARIEDAD BLANCA	++	-	++	++	+	+++	++	++	++	++	-	-	-	-
HOJA DE QUINUA VARIEDAD MORADA	++	-	++	++	+	+++	++	++	++	++	-	-	-	-
HOJA DE QUINUA VARIEDAD FALSA DE VENADO	++	-	++	++	+	+++	++	++	++	++	-	-	-	-
HOJA DE QUINUA VARIEDAD TUCABUANI	++	-	++	++	+	+++	++	++	++	++	-	-	-	-
GRANO DE CERCEO VARIEDAD CHILLA	+	-	+	++	+	++	-	-	++	+	-	+++	+++	+++
GRANO DE CERCEO VARIEDAD INAPAHU	+	-	+	++	+	++	-	-	++	+	-	+++	+++	+++
GRANO DE CERCEO VARIEDAD INAPAHU	+	-	+	++	+	++	-	-	++	+	-	+++	+++	+++
HOJA DE CERCEO VARIEDAD CHILLA	++	-	++	++	+	++	++	-	++	+	-	++	++	++
HOJA DE CERCEO VARIEDAD INAPAHU	++	-	++	++	+	++	++	-	++	+	-	++	++	++
HOJA DE CERCEO VARIEDAD INAPAHU	++	-	++	++	+	++	++	-	++	+	-	++	++	++
HOJA DE CERCEO VARIEDAD CHILLA	++	-	++	++	++	++	++	-	+	++	-	++	++	++
GRANO DE AMARANTO VARIEDAD ALEGRÍA	++	-	++	++	++	+++	+	+	+++	++	-	-	-	-
GRANO DE AMARANTO VARIEDAD PERUCHO	++	-	++	++	++	+++	+	+	+++	++	-	-	-	-
HOJA DE AMARANTO VARIEDAD ALEGRÍA	++	-	++	++	++	+++	++	+	++	++	-	-	-	-
HOJA DE AMARANTO VARIEDAD PERUCHO	++	-	++	++	++	+++	++	+	++	++	-	-	-	-
GRANO DE SANGORACHE	++	-	++	++	++	+++	+	+	++	++	-	-	-	-
HOJA DE SANGORACHE	++	-	++	++	++	+++	++	+	++	++	-	-	-	-
FANCHA DE SANGORACHE	++	-	++	+	+	++	++	-	+	+	-	-	-	-

Abundante: +++ Moderado: ++ Escaso: + Negativo: -

**Gráfico 1-3** Tamizaje Fitoquímico de las hojas y granos de *Chenopodium quinoa* y Amaranto  
Fuente: (Guapi 2014)

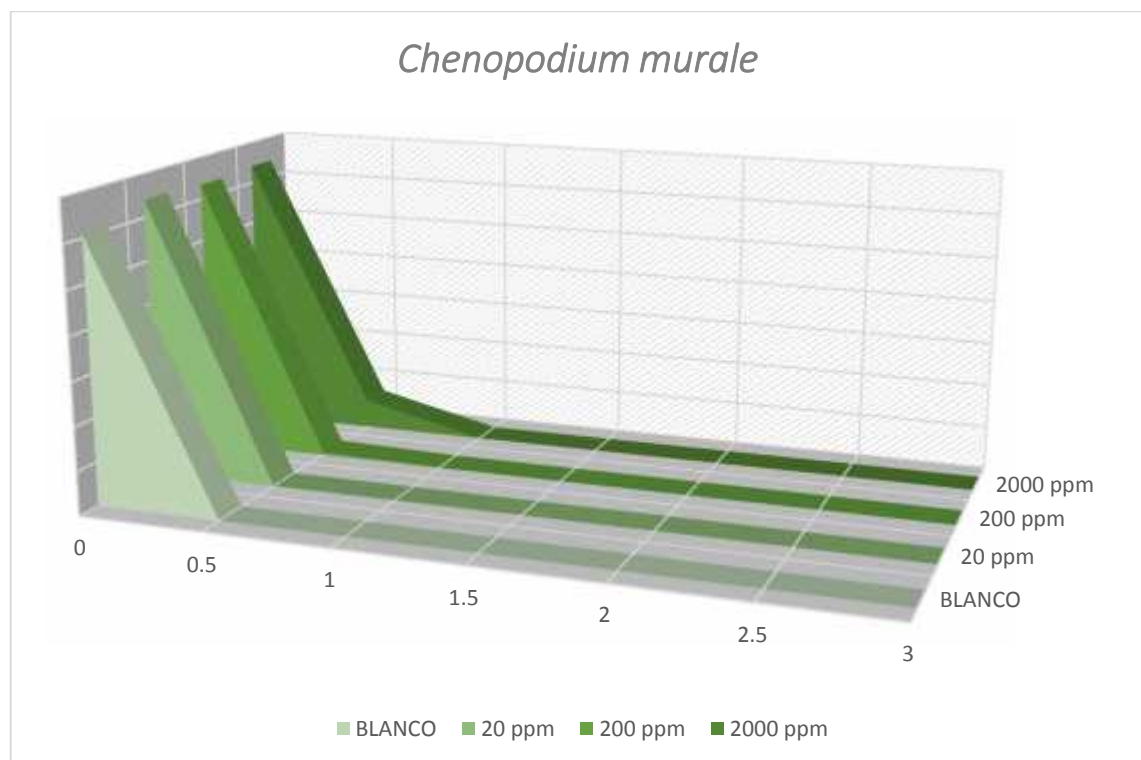
### 3.4 Ensayo de muerte celular inducida

Después de haber sometido las cepas de *Escherichia coli* a radiación UVB durante 7 tiempos a intervalos de 30 minutos y bajo protección de los extractos etanólicos de *Chenopodium murale* a concentraciones de 20 ppm, 200 ppm y 2000 ppm, se sembraron 5 µL de la suspensión bacteriana en agar nutritivo, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 5-3** UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, bajo protección de los extractos etanólicos de *Ch. murale* a 20, 200 y 2000 ppm.

TIEMPO (H)	BLANCO UFC	20 ppm UFC	200 ppm UFC	2000 ppm UFC
0	121333333	128000000	126666667	128000000
0.5	0	0	1333333	13333333
1	0	0	0	400
1.5	0	0	0	67
2	0	0	0	0
2.5	0	0	0	0
3	0	0	0	0

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.



**Figura 1-3** UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, fotoprotección de los extractos etanólicos de *Ch. murale* a 20, 200 y 2000 ppm.

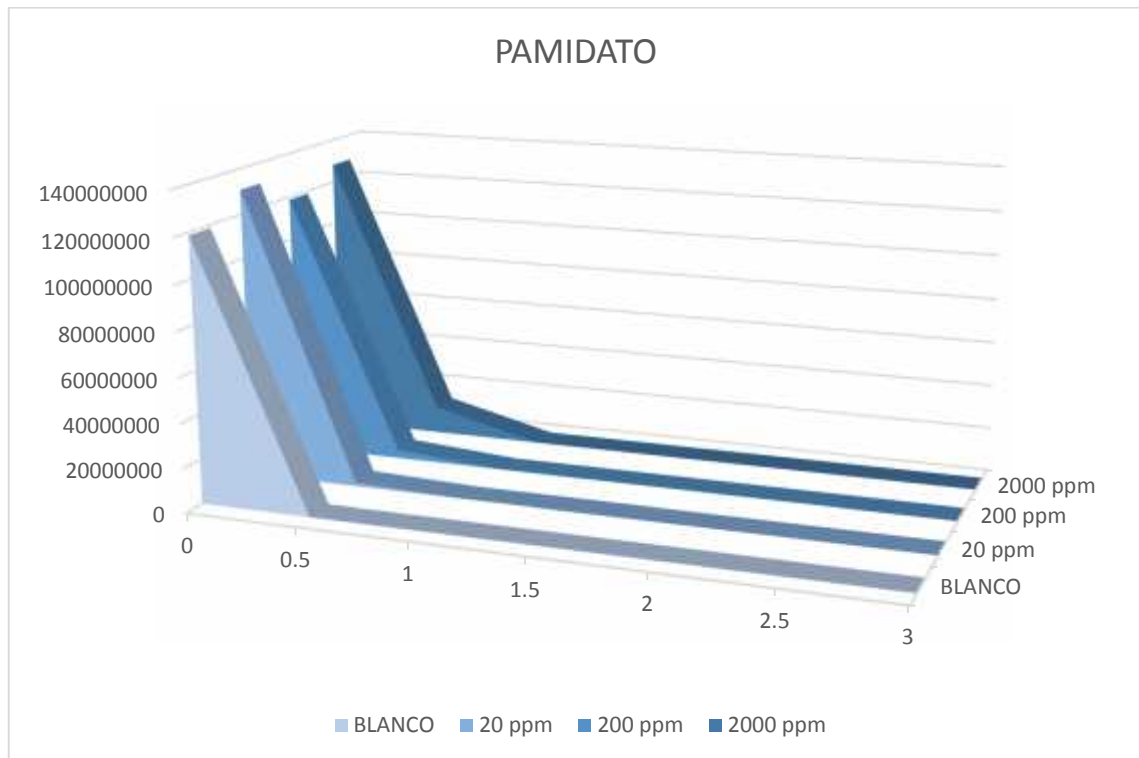
Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

Se realizó el mismo procedimiento para los controles OMC y PAMIDATO y se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 6-3** UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, bajo protección de PAMIDATO

TIEMPO (H)	BLANCO UFC	20 ppm UFC	200 ppm UFC	2000 ppm UFC
0	118666667	130666667	118666667	128000000
0.5	0	1666666,67	3666666,67	12333333,3
1	0	0	266,666667	600
1.5	0	0	0	133,333333
2	0	0	0	0
2.5	0	0	0	0
3	0	0	0	0

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.



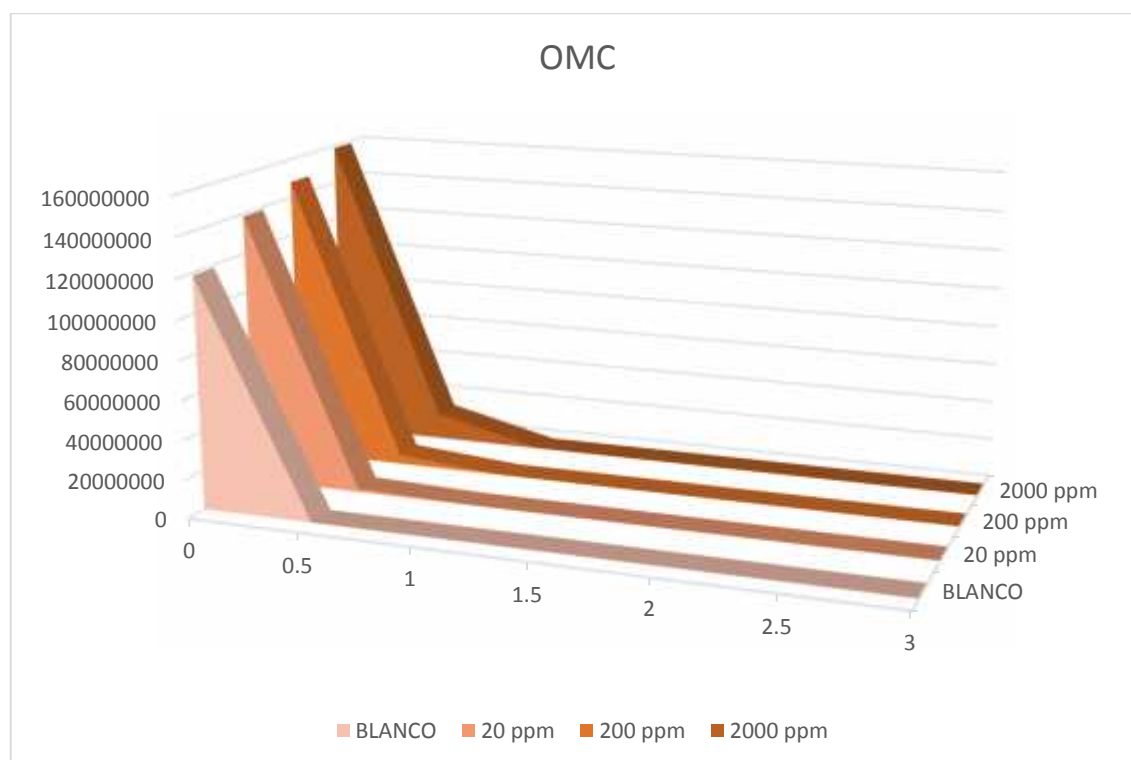
**Figura 2-3** UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, fotoprotección de PAMIDATO.

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

**Tabla 7-3** UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, bajo protección de OCTILMETOXICINAMATO

<i>TIEMPO (H)</i>	<b>BLANCO UFC</b>	<b>20 ppm UFC</b>	<b>200 ppm UFC</b>	<b>2000 ppm UFC</b>
0	118666667	138666667	148000000	158666667
0.5	0	1666666,67	4666666,67	13666666,7
1	0	0	333,333333	1133,33333
1.5	0	0	0	533,333333
2	0	0	0	133,333333
2.5	0	0	0	0
3	0	0	0	0

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.



**Figura 3-3** UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, fotoprotección de OCTILMETOXICINAMATO.

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

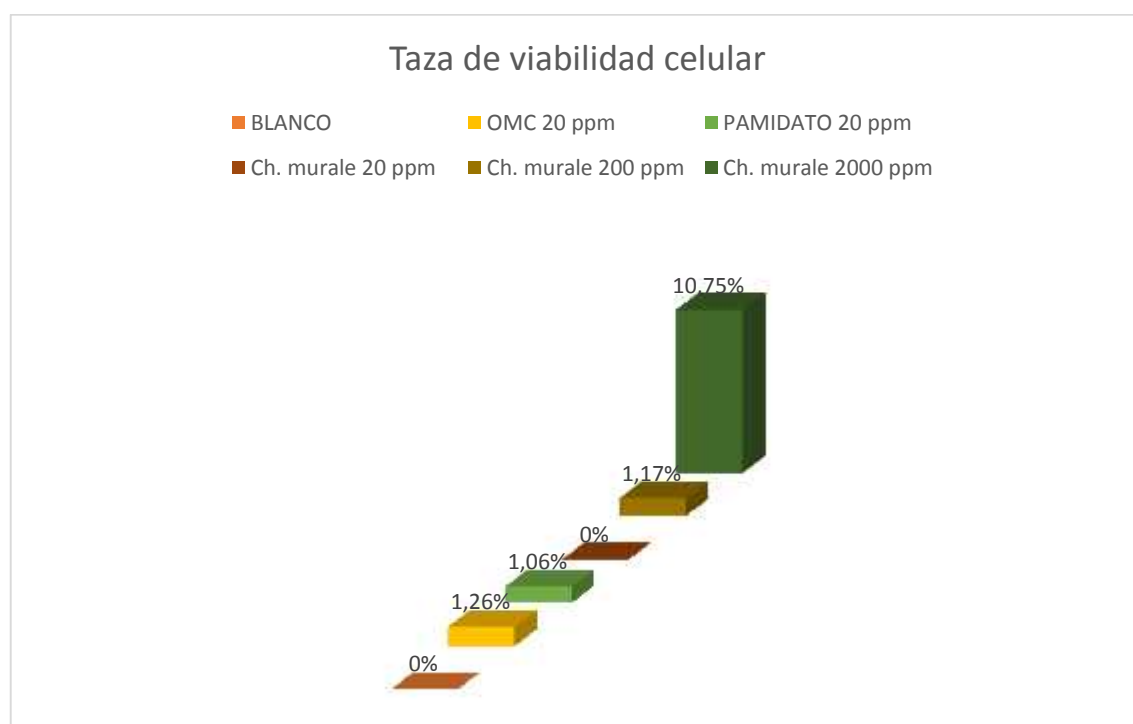


Para realizar el análisis estadístico de Anova para un factor, se determinó la tasa de viabilidad celular total al final del ensayo de muerte celular inducida, para cada concentración de los extractos y de los controles OMC y PAMIDATO.

**Tabla 8-3** Taza de viabilidad celular total al final del ensayo de muerte celular inducida.

BLANCO	OMC 20 ppm	PAMIDATO 20 ppm	<i>Ch. murale</i> 20 ppm	<i>Ch. murale</i> 200 ppm	<i>Ch. murale</i> 2000 ppm
0%	1,26%	1,06%	0%	1,17%	10,75%

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.



**Figura 4-3** Taza de viabilidad celular total al final del ensayo de muerte celular inducida.

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

Una vez realizado el análisis estadístico de Anova para un factor entre los porcentajes de viabilidad celular de los extractos de *Chenopodium murale* a diferentes concentraciones y los controles, se encontró que existe diferencia significativa en al menos un porcentaje de viabilidad celular.

***Extracto etanólico de Chenopodium murale a 20 ppm.***

El extracto etanólico de *Ch. murale* a 20 ppm, presentó un tasa de viabilidad celular del 0% después de realizar el ensayo de muerte celular inducida, es decir no mostró protección contra la radiación UVB, esto se evidencia al no existir crecimiento bacteriano después de haber realizado la siembra de 5 µL de la suspensión bacteriana de *E. coli* en el agar nutritivo después de cada tiempo de exposición a la radiación UVB, por lo que este extracto a dicha concentración no mostró actividad fotoprotectora.

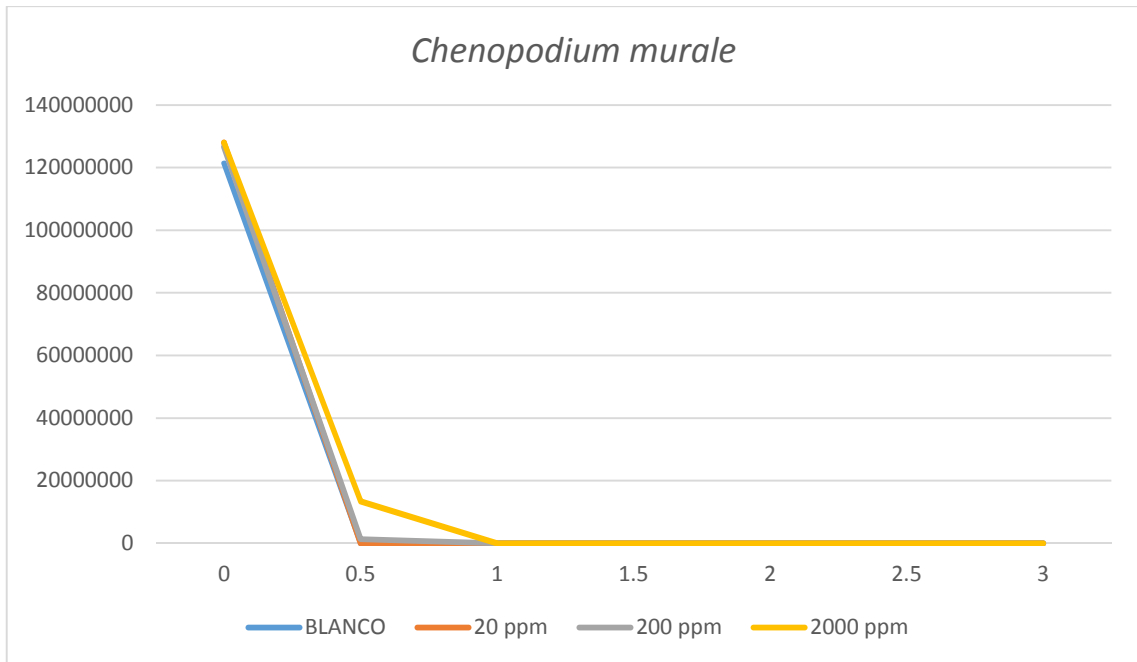
***Extracto etanólico de Chenopodium murale a 200 ppm.***

El extracto de *Ch. murale* a esta concentración presentó una tasa de viabilidad celular del 1.17% al finalizar el ensayo de muerte celular inducida, este porcentaje es muy similar a la tasa de viabilidad celular de los controles OMC y PAMIDATO, que fue de 1.26% y 1.06% respectivamente. Sin embargo hay que tomar en cuenta que la concentración del extracto es mayor (200 ppm), al de los controles, para presentar tasas de viabilidad celular semejantes a las de OMC y PAMIDATO.

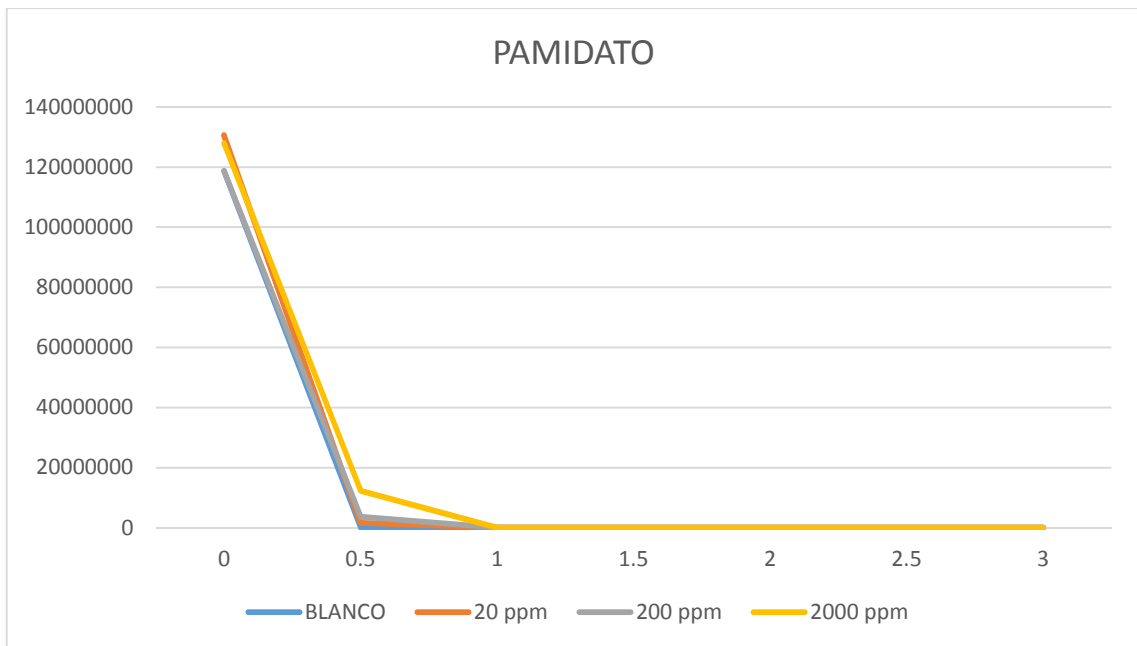
***Extracto etanólico de Chenopodium murale a 2000 ppm.***

A esta concentración el extracto de *Ch. murale* presenta una diferencia significativa en la tasa de viabilidad celular, comparada con los controles OMC y PAMIDATO, y las otras concentraciones a las que se prepararon los extractos de *Ch. murale*, presentando una tasa de viabilidad celular del 10.75% al final del ensayo de muerte celular inducida, lo que significa que el extracto a 2000 ppm presenta un efecto fotoprotector mucho mayor al de los controles y al de las otras concentraciones de los extractos etanólicos con que se realizó el ensayo de muerte celular inducida.

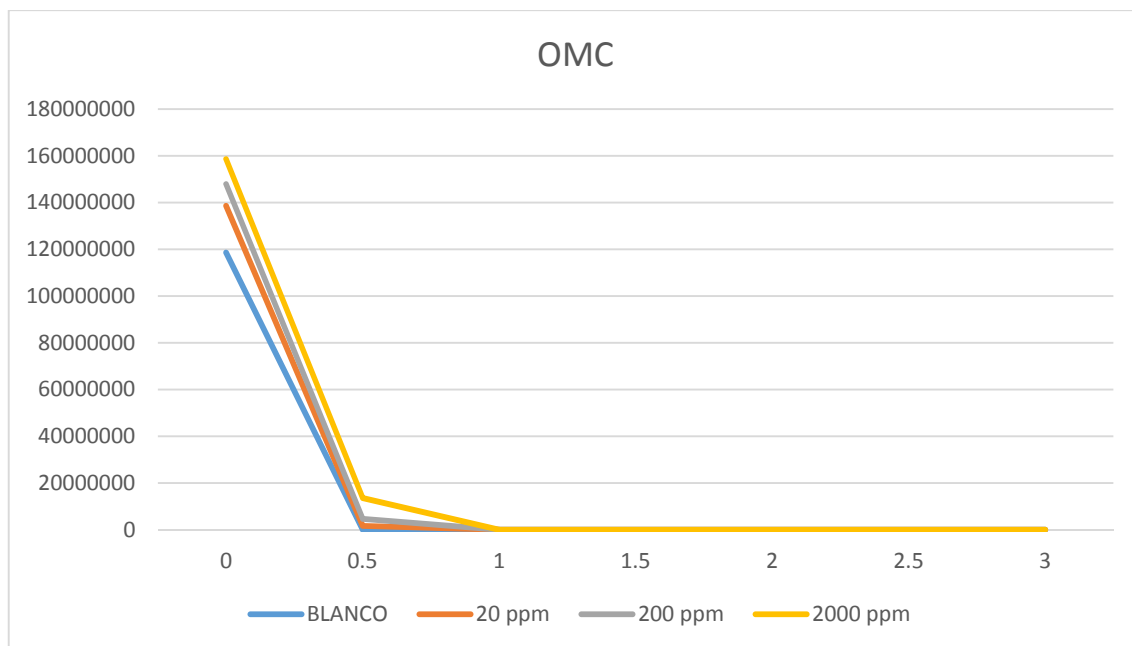
En la gráficas que se muestran a continuación se puede observar de manera clara el efecto fotoprotector del extracto etanólico de *Chenopodium murale* a una concentración de 20 ppm y de los controles, lo que permite comparar el número de UFC sobrevivientes a medida que se van sometiendo las cepas de *E. coli* a radiación UVB en los diferentes tiempos.



**Figura 5-3** UFC sobrevivientes después de la exposición a radiación UVB vs tiempo (Fotoprotección de *Chenopodium murale*)  
**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.



**Figura 6-3** UFC sobrevivientes después de la exposición a radiación UVB vs tiempo (Fotoprotección de Pamidato)  
**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.



**Figura 7-3** UFC sobrevivientes después de la exposición a radiación UVB vs tiempo (Fotoprotección de OMC)  
**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.

Analizando las gráficas se puede constatar que el efecto fotoprotector del extracto etanólico de *Ch. murale* a 2000 ppm, es mucho mayor al que presentan los extractos etanólicos de 20 ppm y 200 ppm. Esto se puede comprobar al observar el número de UFC viables después de cada tiempo a de exposición a la radiación UVB, presentando un número mayor de UFC viables el extracto etanólico de 2000 ppm.

Sin embargo se puede observar que el efecto fotoprotector dura hasta la primera hora y media (tiempo 3), de exposición a la radiación UVB, ya que después de este tiempo el número de UFC cae a 0. En el tiempo 3 (1.5 H), no se puede observar el número real de UFC en la gráfica debido a la escala de la misma, pero como se observa en la Tabla 6-3, en este tiempo las UFC existentes son 133.333.

### 3.5 Factor de Protección Solar

Después de haber medido las absorbancias del extracto etanólico de *Ch. murale* a 20 ppm, a las longitudes de onda de 290 nm, 295nm, 300 nm, 305 nm, 310 nm, 315 nm y 320 nm, se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 9-3** Absorbancias del extracto etanólico de *Ch. murale* a 20 ppm, en el rango de 290 a 320 nm.

ABS	
290	0,092
295	0,09
300	0,092
305	0,092
310	0,093
315	0,095
320	0,098

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

Después de haber obtenido las absorbancias, se procedió a calcular el FPS mediante la ecuación de Mansur:

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

En donde el producto del espectro de efecto eritemal (EE) y la intensidad del espectro solar (I), se encuentra tabulado en datos bibliográficos para cada longitud de onda, que se presenta en la siguiente gráfico:

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
<b>Total</b>	<b>1.0000</b>

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

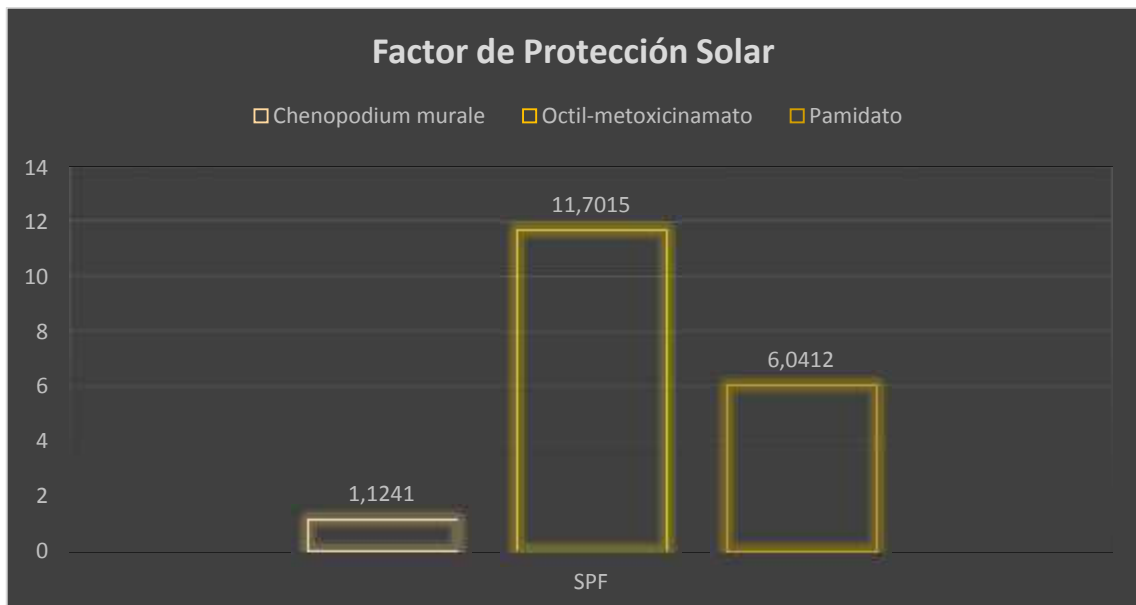
**Gráfico 2-3** Función del producto normalizado utilizado en el cálculo de FPS  
Fuente: (Dutra et al. 2004)

Una vez aplicada la ecuación de mansur se obtuvieron los siguientes valores de FPS para el extracto etanólico de *Ch. murale* a 20 ppm y para los controles OMC y PAMIDATO que se obtuvieron bajo el mismo procedimiento.

**Tabla 10-3** Valores de FPS del extracto de *Ch. murale* 20 ppm, OMC y PAMIDATO

	SPF
<i>Chenopodium murale</i>	1,1241
Octil-metoxicinamato	11,7015
Pamidato	6,0412

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.



**Figura 8-3** Valores de FPS del extracto etanólico de *Ch. murale* 20 ppm, OMC y PAMIDATO  
Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

Comparando los resultados del Factor de Protección Solar, obtenidos a través de la ecuación de Mansur se puede observar que el FPS del extracto de *Ch. murale* a 20 ppm es mucho menor comparado con los controles OMC y PAMIDATO. Para evitar la saturación del equipo se prepara la muestra a 10 ppm, pero al preparar el extracto de *Ch. murale* a esta concentración, no se pudo registrar absorbancia alguna y por este motivo se aumentó la concentración a 20 ppm.

Sin embargo a esta concentración el extracto de *Ch. murale* presentó un valor sumamente bajo de FPS (1.1241), esto se debe a que la concentración del extracto es baja, y como se observó en el ensayo de muerte celular inducida, el extracto a la concentración de 20 ppm no presentó actividad fotoprotectora alguna.

Comparado con la nueva nomenclatura del Colipa, también se considera como un valor bajo de FPS.

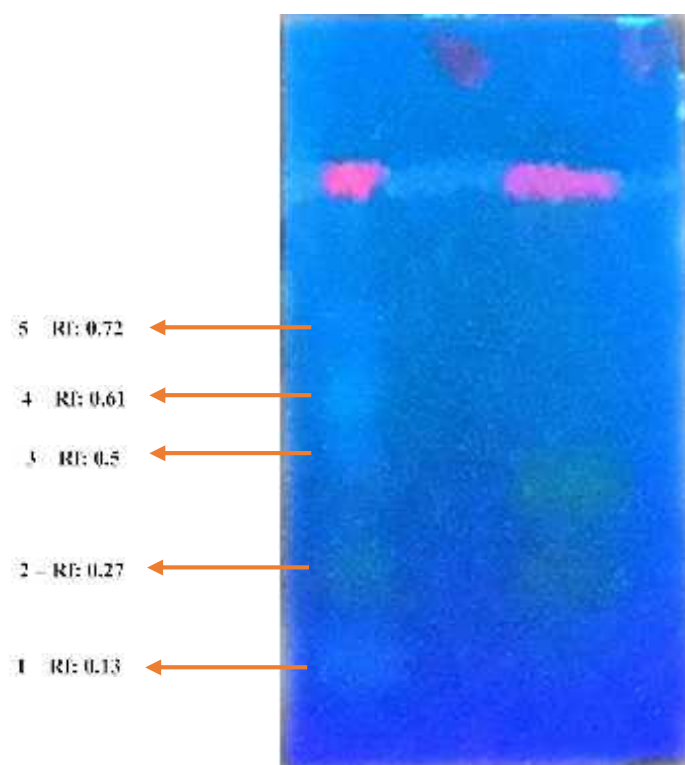
Nueva nomenclatura COLIPA de índices de Protección UVB	
Tipo de protección	Factor de protección solar
Baja	2/4/6
Media	8/10/12
Alta	15/20/25
Muy alta	30/40/50
Ultra	50+ (FPS > 60)

**Gráfico 1-3** Nomenclatura COLIPA de índices de protección UVB

Fuente: (Farmacia Profesional 2005)

### 3.6 Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía en capa fina se realizó con un sistema de solventes específico para la identificación de flavonoides, este sistema de solventes está conformado por: acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26), que sirve para identificar exclusivamente glicósidos de flavona, flavonol y de tipo flavonona (Serie A), y varios O - glicósidos de quercetina y kaempferol (Serie B).



**Gráfico 2-3** Placa cromatográfica del extracto alcohólico de *Chenopodium murale*  
**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.

Los compuestos encontrados en la especie vegetal *Chenopodium murale*, después de haber revelado la placa cromatográfica con  $AlCl_3$  y posteriormente con PEG 400, se compararon con los compuestos de referencia de las Series A y B antes mencionados, la comparación se expresa en la Tabla 11-3.

**Tabla 11-3** Resultados de la Cromatografía en Capa Fina comparados con los compuestos de referencia de las Series A y B

Serie A		Serie B		<i>Chenopodium murale</i>		
Rf	Compuesto	Rf	Compuesto	Rf	Compuesto	Posible Compuesto
-	-	-	-	0.13	1	-
0.27	kaempferol-3-O-gentobioside	-	-	0.27	2	kaempferol-3-O-gentobioside
-	-	-	-	0.5	3	-
-	-	0.61	kaempferol-3,7-O-dirhamnósido	0.61	4	kaempferol-3,7-O-dirhamnósido
0.72	isorhamnetin-3-O-glucósido	-	-	0.72	5	isorhamnetin-3-O-glucósido

**Realizado por:** TOBAR, Ángel, 2016.

Una vez comparados los resultados en la tabla anterior, 3 de los 5 compuestos encontrados en la especie vegetal *Ch. murale*, poseen valores de Rf idénticos a los compuestos de referencia con los que se compararon, comprobando la presencia de los mismos en dicha especie y son los siguientes:

- Compuesto 2: kaempferol-3-O-gentobioside
- Compuesto 4: kaempferol-3,7-O-dirhamnósido
- Compuesto 5: isorhamnetin-3-O-glucósido

Como se puede observar en la placa cromatográfica, la mancha más clara corresponde al compuesto 4, que es kaempferol-3,7-O-dirhamnósido, el mismo que también se ha identificado



en el estudio “Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*” (Gohar, Maatooq y Niwa 2000), en donde se realizó una Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía en Columna y Espectrofotometría para su identificación.

Lo que brinda una base teórica sólida para respaldar los resultados obtenidos en este análisis.

### 3.7 Cuantificación de flavonoides totales

Se realizó la cuantificación de flavonoides totales presentes en el extracto de *Ch. murale*, elaborando una curva de calibración estándar de quercetina. La ecuación de la recta resultante fue  $y = 0.0011x + 0.0015$ , y su coeficiente de correlación fue de 0.995.

Para el ensayo se realizaron diluciones para obtener absorbancias que se encuentren dentro del rango de 0.06 para elaborar la curva de calibración, el ensayo se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 12-3, en porcentaje de equivalentes de quercetina por miligramo.

**Tabla 12-3** Cuantificación de Flavonoides Totales en el extracto de *Ch. murale* expresados en porcentaje de equivalentes de quercetina por miligramo.

ENSAYO	% FTEQ
1	14,4769
2	13,6126
3	15,3412

Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

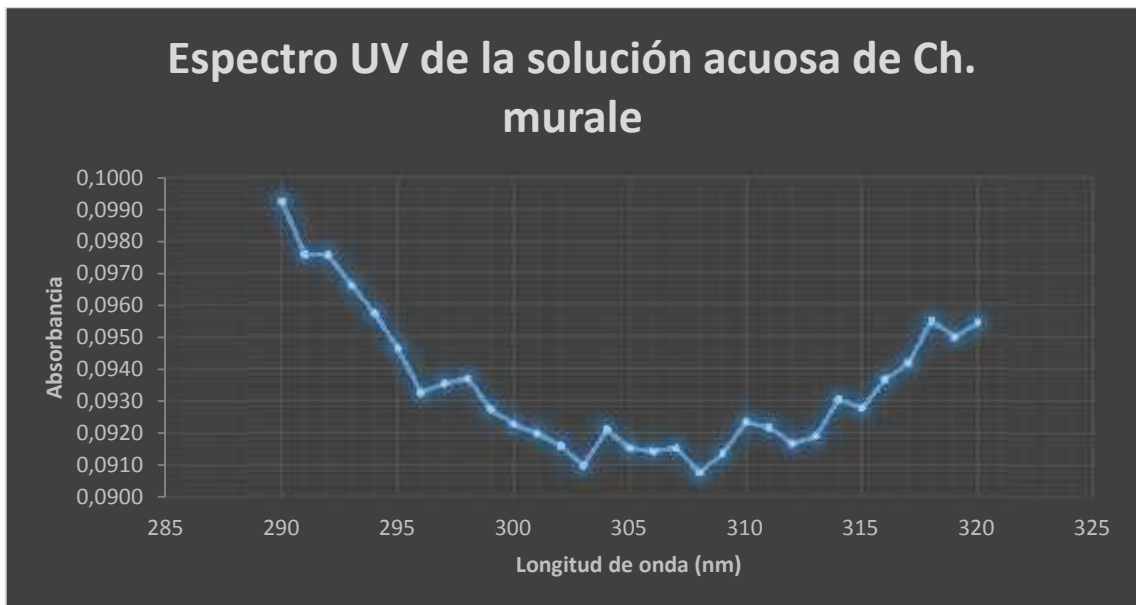
El promedio de los resultados es de 14,5% de flavonoides totales expresados como quercetina presentes en el extracto liofilizado, este valor comparado con datos bibliográficos, se asemeja con el obtenido en el estudio “Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales” (Gracia Nava 2006).

Sin embargo la cantidad encontrada es relativamente baja comparada con otros valores de Flavonoides Totales que se encontraron en otras especies vegetales en donde se investigó también la actividad fotoprotectora y que presentaron un mayor efecto fotoprotector.

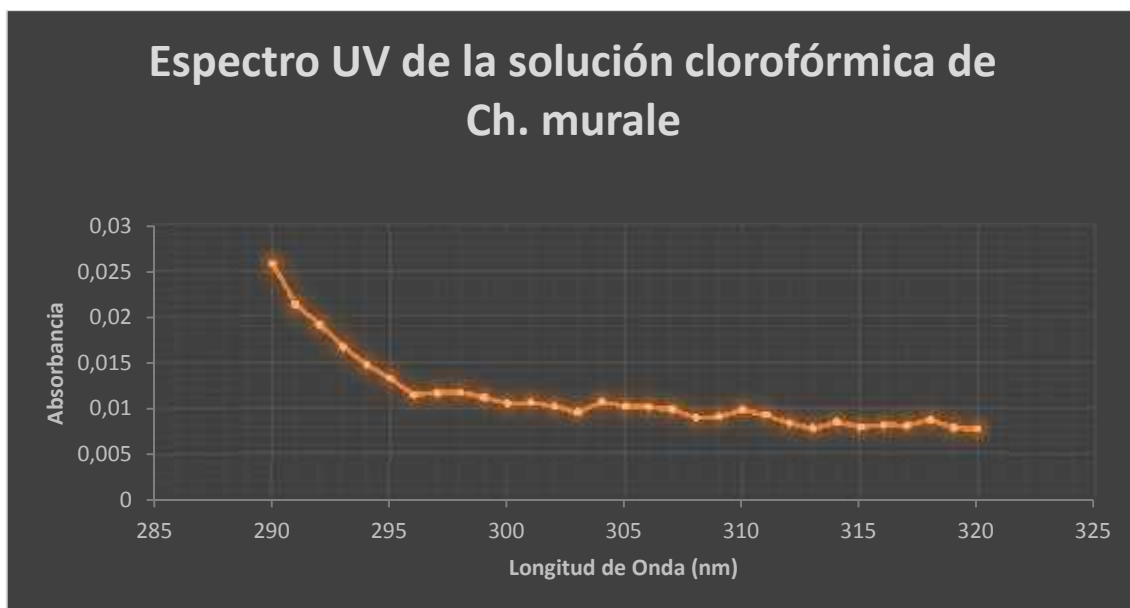
### 3.8 Barrido por Espectrofotometría UV



**Figura 9-3** Espectro UV de la solución etanólica de *Ch. murale*  
 Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.

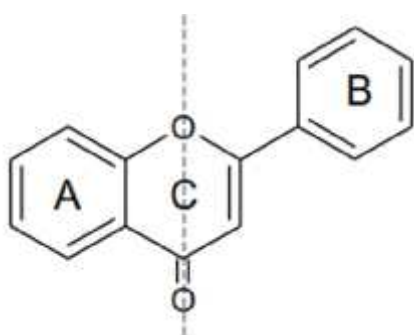


**Figura 10-3** Espectro UV de la solución acuosa de *Ch. murale*  
 Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016.



**Figura 11-3** Espectro UV de la solución clorofórmica de *Ch. murale*  
Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016

Según el estudio “Identificación de Flavonoides con Actividad Antioxidante Presentes en *Alchornea coelophylla* (*Euphorbiaceae*)”, los flavonoides pueden presentar dos niveles máximos de absorción que varían en intensidad y longitudes de onda según la naturaleza del núcleo flavonólico; uno a longitud de onda corta (320-385 nm) referido como banda I correspondiente al sistema aromático B y otro a longitud de onda larga (250-285 nm) referido como banda II correspondiente al sistema aromático A, debido a la existencia de dos grupos cromóforos ilustrados en el Gráfico 9-3, los grupos cinamoilo y benzoilo, respectivamente:



**Gráfico 3-3** Grupos cromóforos de los flavonoides  
Fuente: (Martínez 2014)

De esta manera, las flavonas y flavonoles, por contar con su insaturación entre los carbonos 2 y 3 del anillo pirano, presentan sus dos bandas de absorción de intensidad considerable en los rangos (310-350) nm y (350-385) nm para la banda I, y (250-280) nm para las bandas II,

respectivamente. Es de destacar el hecho de que la absorción de la banda I en flavonoles 3-substituidos sufre un desplazamiento a longitudes de ondas más cortas (desplazamiento hipsocrómico) (Martínez 2014).

Además de estos datos se conoce que las isoflavonas y dihidroflavonoides presentan absorción en dos bandas que se presentan en el Gráfico 6-3

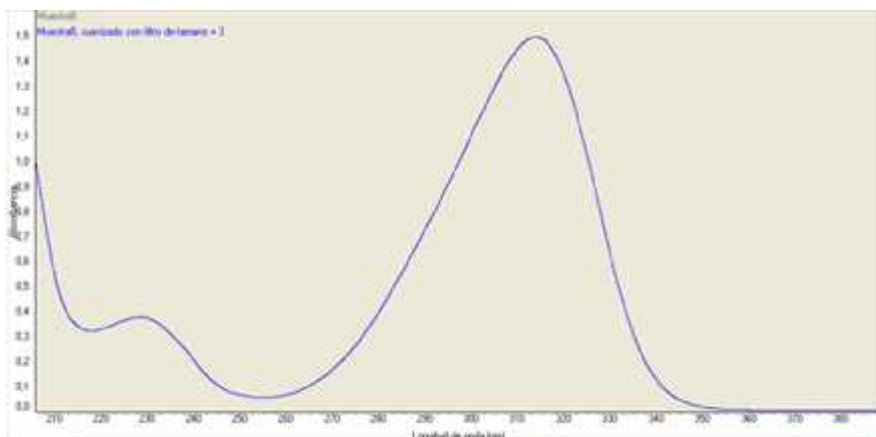
**Tabla 3.4.** Valor de absorción para las Bandas BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides<sup>9</sup>

Banda II, nm	Banda I, nm	Tipo de flavonoide
250-280	310-350	flavonas
250-280	330-360	flavonoles (3-OH sustituido)
250-280	350-385	flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330h	isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxi)
275-295	300-330h	isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270 (baja intensidad)	340-390	chalconas
230-270 (baja intensidad)	380-430	auronas
270-280	465-560	antocianidinas, antocianinas

**Gráfico 4-3** Bandas de absorción de los diferentes tipos de flavonoides

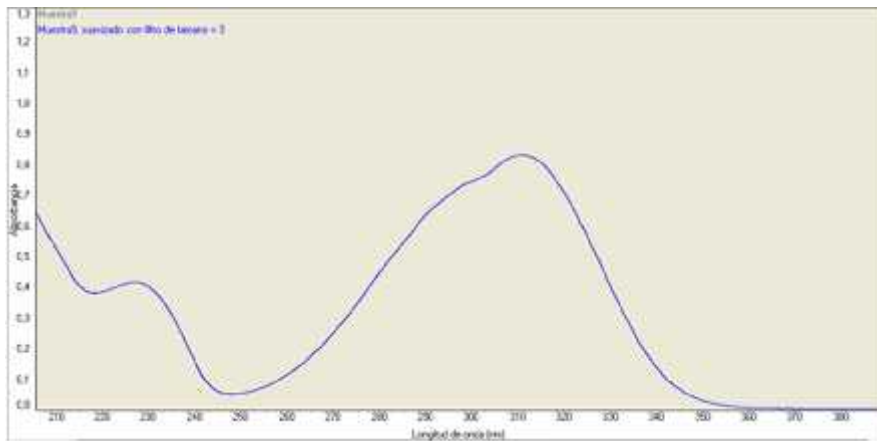
Fuente: (Lock 1997)

Comparando con los picos de absorción presentados por los controles OMC y PAMIDATO se puede observar que los picos presentados por la especie vegetal *Chenopodium murale* presentan picos de absorción en el mismo rango de longitud de onda, 300nm – 320nm. Lo que ratifica la presencia de dihidroflavonoides.



**Gráfico 5-3** Espectro de la solución etanólica de PAMIDATO

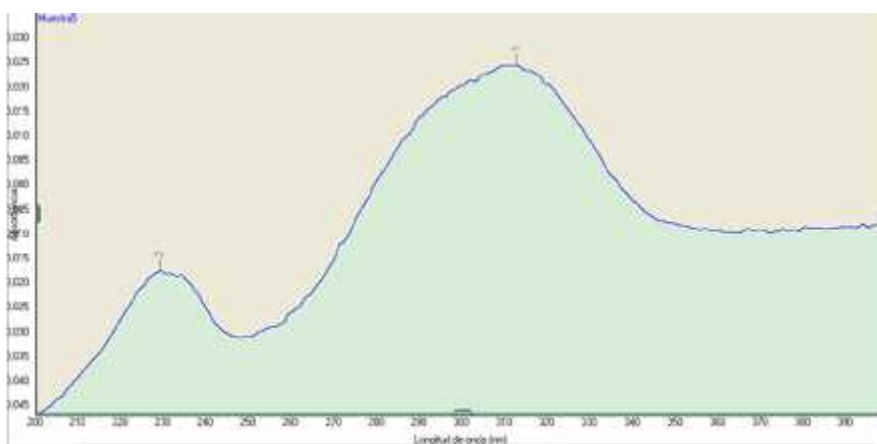
Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016



**Gráfico 6-3** Espectro de la solución etanólica de OMC  
 Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016



**Gráfico 7-3** Espectro de la solución acuosa de OMC  
 Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016



**Gráfico 8-3** Espectro de la solución acuosa de OMC  
 Realizado por: TOBAR, Ángel, 2016

La solución clorofórmica del extracto de *Chenopodium murale* no presentó picos de absorción debido a que la polaridad del cloroformo no es idónea para extraer mayor cantidad de flavonoides.

## CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad fotoprotectora de los extractos etanólicos de *Chenopodium murale*, en donde se comprobó que el extracto etanólico a una concentración de 2000 ppm presenta actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB, evidenciando el crecimiento celular de las cepas de *Escherichia coli* después de haber sido sometidas a dicha radiación, observándose la presencia de UFC hasta 1.5 horas después de haber sido sometidas a radiación y presentando una tasa de viabilidad celular del 10,75% una vez finalizado el ensayo de muerte celular inducida.
2. Se comprobó la presencia de posibles compuestos responsables de la actividad fotoprotectora a la concentración de 2000 ppm en la especie vegetal *Chenopodium murale*, mediante cromatografía en capa fina (TLC), en donde se presume la presencia de tres compuestos, dos O-glicósidos de kaempferol, kaempferol-3-O-gentobioside y kaempferol-3,7-O-dirhamnósido, y un glicósido de flavonol, isorhamnetin-3-O-glucósido.
3. Se calculó el Factor de Protección Solar (FPS), mediante espectrofotometría y aplicando la ecuación de Mansur, obteniéndose un FPS de 1.12 para el extracto etanólico de *Chenopodium murale* a 20 ppm.

4. El valor obtenido de Flavonoides Totales, de 14.5%, es relativamente bajo comparado con otros valores encontrados en especies vegetales utilizadas en estudios de fotoprotección.
  
5. Bajo el método propuesto por Ávila Acevedo, se establece que la especie vegetal *Chenopodium murale*, con un sistema fotosintético de tipo C4, no posee una actividad fotoprotectora ideal que pueda ser evidenciada, y que al ser una planta que crece en ambientes extremos, puede presentar otros sistemas de fotoprotección, conformados por otros componentes químicos o que puedan funcionar de manera conjunta, con los hallados en la presente investigación.

#### **RECOMENDACIONES:**

1. Tener bases teóricas sobre la composición química de la planta objeto de estudio, para poder optimizar los procesos de extracción y para relacionar y sustentar los resultados obtenidos.
  
2. Para futuros ensayos de fotoprotección se deben utilizar cepas bacterianas que sean almacenadas bajo condiciones óptimas y que cada cierto tiempo sean reemplazadas por cepas más viables, con el fin de obtener resultados más reales en el ensayo de muerte celular inducida.
  
3. Estandarizar una técnica para el ensayo de muerte celular inducida, para obtener resultados comparables, eficaces y reproducibles entre ensayos.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

**ACEITUNO-MADERA, P., et al.** Melanoma, altitud y radiación UVB. *Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2011. vol. 102, no. 3, pp. 199-205. ISSN 00017310. DOI 10.1016/j.ad.2010.08.003.

[Citado el: 02 de octubre de 2016]

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001731010004709>.

**AMBLARD, P.** Fotodermatosis. Fotoprotección. *EMC - Pediatría* [en línea], 2001. vol. 36, no. 1, pp. 1-9. ISSN 12451789. DOI 10.1016/S1245-1789(01)72018-5.

[Citado el: 20 de mayo de 2016]

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1245178901720185>.

**AVILA ACEVEDO, J.G., et al.** Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. 2005. vol. 76, pp. 301-309. DOI 10.1016/j.fitote.2005.03.009.

**BECTON, D. and C.** Patrón de turbidez BBL preparado McFarland Turbidity Standard No. 0.5. 2005



**BOLUFER, P.** La fotosíntesis C4, de alto rendimiento - Agricultura. [en línea]. 2010.

[Citado el: 26 de octubre de 2016]

<http://www.interempresas.net/Agricola/Articulos/44231-La-fotosintesis-C4-de-alto-rendimiento.html>.

**CABRERA MORALES, C.M. y LÓPEZ-NEVOT, M. A.** Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología (Barcelona)*, 2006. vol. 29, no. 7, pp. 25-32. ISSN 0378-4835. DOI 10.4321/S0378-48352006000700003.

**CALLE, A.** Estudio y análisis de la irradiancia eritemática a partir de datos de ozono TOMS. 1998, pp. 1-7.

**CONIDA.** Radiación ultravioleta e índices UV. 2008

**DUTRA, E.A., et al.** Determination of sun protection factor ( SPF ) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004. vol. 40, no. 3, pp. 381-385. ISSN 1516-9332. DOI 10.1590/S1516-93322004000300014.

**EL TIEMPO.** El cáncer de piel. [en línea]. 2015.

[Citado el: 07 de noviembre 2016]

<http://www.eltiempo.com.ec/noticias/Novedades/1/360355/el-cancer-de-piel>.

**ELIKA.** Escherichia coli 28. *Elika*, 2013. pp. 1-5.

**EXA.** ECUADOR COLOMBIA Y PERU RECIBEN LA RADIACION UV MAS ALTA EN TODO EL PLANETA. [en línea]. 2008.

[Citado el: 07 de noviembre 2016]

<http://www.exa.ec/bp21/index-es.html>.

**FARFÁN, C., OLIVA, B. y JAYES, P.** *Determinación de los flavonoides en seis plantas del género Lippia (Verbenaceae) nativas de Guatemala como posibles fuentes de nutraceuticos.* 2012.

**FARMACIA PROFESIONAL.** Fotoprotección y dermatosis. 2005, vol. 19, no. 7, pp. 53.

**GILABERTE, Y. y GONZÁLEZ, S.** Novedades en fotoprotección. *Actas Dermato-Sifiliograficas*, 2010. vol. 101, no. 8, pp. 659-672. ISSN 00017310. DOI 10.1016/j.ad.2010.04.003.

**GOHAR, A.A., MAATOOQ, G.T. y NIWA, M.** Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*, 2000. vol. 53, no. 2, pp. 299-303. ISSN 00319422. DOI 10.1016/S0031-9422(99)00525-7.

**GRACIA NAVA, M.A.** Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales. *Universidad Autonoma de Querétaro*, 2006. pp. 1-4.

**GUAPI, J.** *CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA Y FOTOQUÍMICA DE LOS GRANOS Y HOJAS DEL CHOCHO (Lupinus mutabilis Sweet), QUINUA (Chenopodium quinoa Willd), AMARANTO (Amaranthus caudatus L.) Y SANGOR ACHE (Amaranthus hybridus L.).* 2014.

**LA HORA.** Se dispara el cáncer de piel. [en línea]. 2011.

[Citado el: 07 de noviembre 2016]

[http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101532970#.VnIcr\\_nhDIU](http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101532970#.VnIcr_nhDIU).

**LOCK, O.** Colorantes Naturales. *Colorantes Naturales* [en línea]. 1997. pp. 83.

[Citado el: 05 de noviembre 2016]

[https://books.google.com.ec/books?id=LjmH\\_3qjaEIC&pg=PA83&lpg=PA83&dq=bandas+de+absorcion+de+flavonoides](https://books.google.com.ec/books?id=LjmH_3qjaEIC&pg=PA83&lpg=PA83&dq=bandas+de+absorcion+de+flavonoides)

**MARÍN, D. y DEL POZO, A.** Fototipos cutáneos. Conceptos generales. 2005, vol. 24, pp. 136-137.

**MARTÍNEZ, C.A.** Identificación de Flavonoides con Actividad Antioxidante Presentes en *Alchornea coelophylla* (Euphorbiaceae). 2014, pp. 152.

**MEDRÁN, M.** Muerte celular . Apoptosis y otras formas alternativas de muerte celular . 2008.

**MEJÍA-GIRALDO, J.C., ATEHORTÚA, L. y PUERTAS-MEJÍA, M.Á.** Fotoprotección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 2014. vol. 12, no. 52, pp. 272-281.

**MINSAP.** *Normas Ramales para drogas crudas, extractos y tinturas*. 1992. S.l.: s.n.

**MONDRAGÓN, J. y VIBRANS, H.** Malezas de México - Ficha de *Chenopodium murale*. [en línea]. 2009.

[Citado el: 26 de octubre 2016]

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/chenopodium-murale/fichas/ficha.htm>.

**NATIONAL PARK SERVICE, G.C.N.P.** *Chenopodium murale* L. [en línea]. 2012.

[Citado el: 26 de octubre 2016]

<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=35907>.

**POZZOBON, F., et al.** Características del melanoma cutáneo primario en el Instituto Nacional de Cancerología 2006-2010. *Revista Colombiana de Cancerología* [en línea], 2013. vol. 17, no. 3, pp. 111-118. ISSN 01239015. DOI 10.1016/S0123-9015(13)70013-1.

[Citado el: 20 de septiembre 2016]

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123901513700131>.

**RAMÍREZ, A.R., et al.** Escherichia coli. [en línea], 2010. pp. 1-14.

[Citado el: 26 de octubre 2016]

<http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/escherichia-coli-i.pdf>.

**SABANDO CARRANZA, J.A., et al.** Incidencia del cáncer de piel no melanoma en un cupo del Centro de Salud de Zaramaga. *Atencion Primaria* [en línea], 2015. vol. 47, no. 3, pp. 189-190. ISSN 15781275. DOI 10.1016/j.aprim.2014.05.012.

[Citado el: 01 de septiembre 2016]

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aprim.2014.05.012>.



**SÁNCHEZ, G., et al.** Incidencia de cáncer de piel en Colombia, años 2003-2007. *Piel*, 2011. vol. 26, no. 4, pp. 171-177. ISSN 02139251. DOI 10.1016/j.piel.2010.10.028.

**UNAM.** Cromatografía en placa fina. 2015, pp. 3.

**UNIVERSIDAD DE GRANADA.** Secado por liofilización. 2011, vol. 1, pp. 1-4.

## ANEXOS

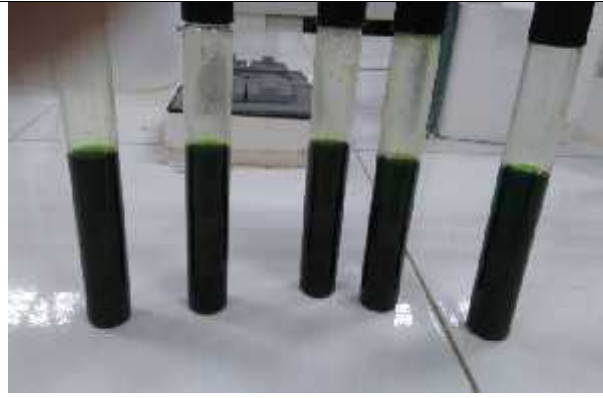
### Anexo A: Tamizaje Fitoquímico

Ensayo de Resinas	Ensayo de Shinoda
	

Fuente: TOBAR, Ángel, 2016

### Anexo B: Obtención del extracto

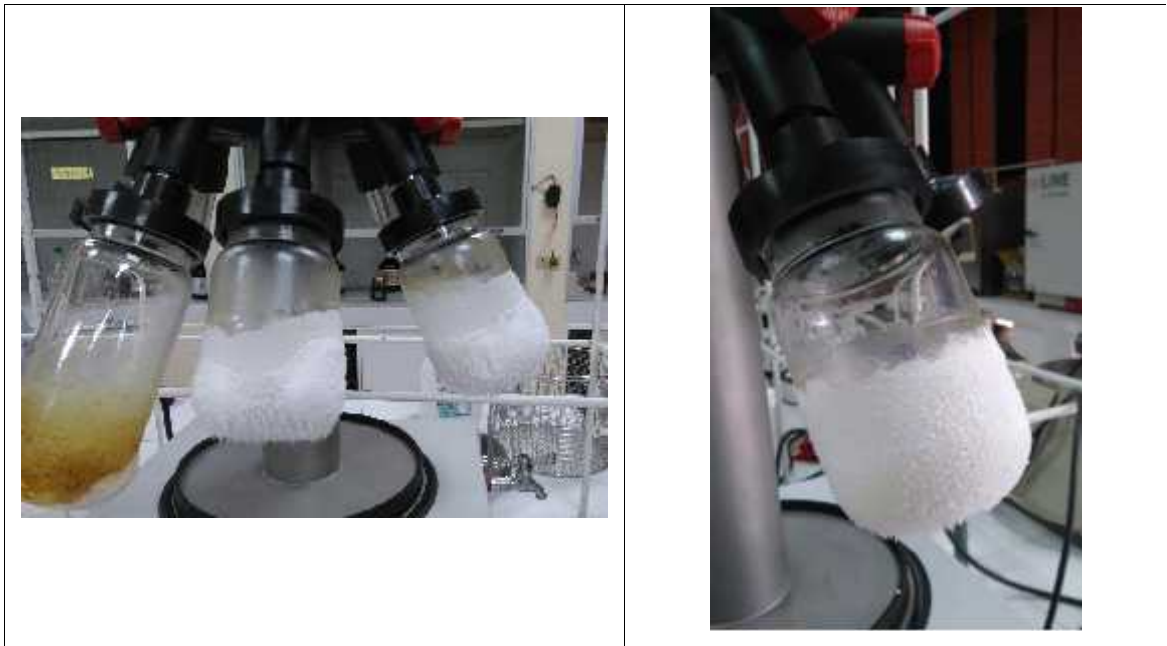
Extracción con etanol al 70%	Concentración en el rotavapor
------------------------------	-------------------------------



Desengrasado con hexano

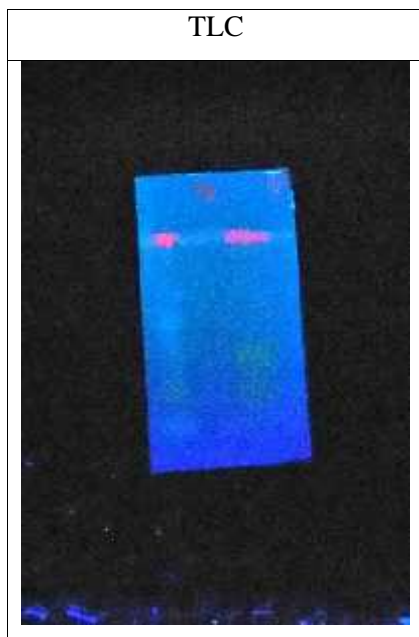


Liofilización



Fuente: TOBAR, Ángel, 2016

### Anexo C: Cromatografía en Capa Fina



Fuente: TOBAR, Ángel, 2016

**Anexo D:** UFC sobrevivientes a la radiación UVB.

Tiempo 1

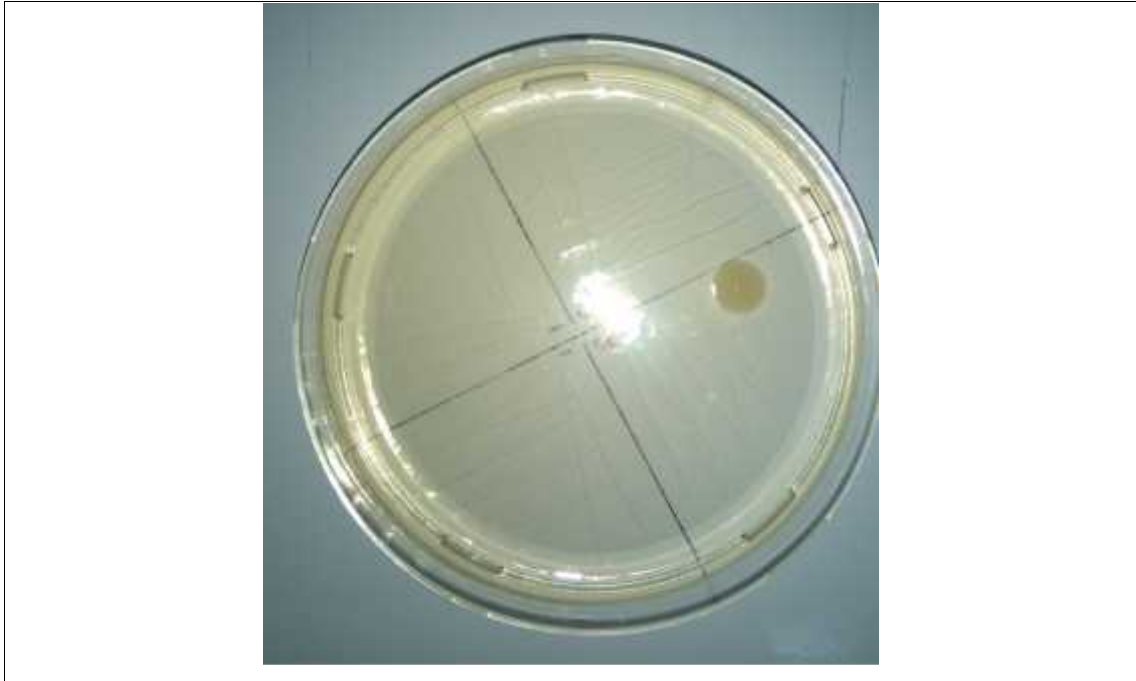


Tiempo 2



Tiempo 3





**Fuente:** TOBAR, Ángel, 2016

**Anexo E:** Análisis estadístico de los extractos etanólicos de *Chenopodium murale*.

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	1,2533	1,17500	,67839	-1,8655	4,1722	,00	2,33
PAD (20 ppm)	3	1,7933	1,58371	,91435	-2,1408	5,7275	,00	3,00
<i>Chenopodium</i> (20 ppm)	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
<i>Chenopodium</i> (200 ppm)	3	1,1667	,79255	,45758	-,8021	3,1355	,66	2,08
<i>Chenopodium</i> (2000 ppm)	3	10,7533	2,70844	1,56372	4,0252	17,4815	7,93	13,33
Total	15	2,9933	4,26490	1,10119	,6315	5,3552	,00	13,33

Prueba de homogeneidad de varianzas

% DE SUPERVIVENCIA DE *E.coli*

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,821	4	10	,099

ANOVA

% DE SUPERVIVENCIA DE *E.coli*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	230,946	4	57,736	24,358	,000
Dentro de grupos	23,705	10	2,371		
Total	254,651	14			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: % DE SUPERVIVENCIA DE *E.coli*

HSD Tukey

(I) SUSTANCIA	(J) SUSTANCIA	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
FOTOPROTECTORA	FOTOPROTECTORA					
OMC (20 ppm)	PAD (20 ppm)	-,54000	1,25711	,992	-4,6773	3,5973
	<i>Chenopodium</i> (20 ppm)	1,25333	1,25711	,851	-2,8839	5,3906
	<i>Chenopodium</i> (200 ppm)	,08667	1,25711	1,000	-4,0506	4,2239
	<i>Chenopodium</i> (2000 ppm)	-9,50000	1,25711	,000	-13,6373	-5,3627
PAD (20 ppm)	OMC (20 ppm)	,54000	1,25711	,992	-3,5973	4,6773
	<i>Chenopodium</i> (20 ppm)	1,79333	1,25711	,626	-2,3439	5,9306
	<i>Chenopodium</i> (200 ppm)	,62667	1,25711	,986	-3,5106	4,7639
	<i>Chenopodium</i> (2000 ppm)	-8,96000	1,25711	,000	-13,0973	-4,8227
<i>Chenopodium</i> (20 ppm)	OMC (20 ppm)	-1,25333	1,25711	,851	-5,3906	2,8839
	PAD (20 ppm)	-1,79333	1,25711	,626	-5,9306	2,3439
	<i>Chenopodium</i> (200 ppm)	-1,16667	1,25711	,880	-5,3039	2,9706
	<i>Chenopodium</i> (2000 ppm)	-10,75333	1,25711	,000	-14,8906	-6,6161
<i>Chenopodium</i> (200 ppm)	OMC (20 ppm)	-,08667	1,25711	1,000	-4,2239	4,0506
	PAD (20 ppm)	-,62667	1,25711	,986	-4,7639	3,5106
	<i>Chenopodium</i> (20 ppm)	1,16667	1,25711	,880	-2,9706	5,3039
	<i>Chenopodium</i> (2000 ppm)	-9,58667	1,25711	,000	-13,7239	-5,4494
<i>Chenopodium</i> (2000 ppm)	OMC (20 ppm)	9,50000	1,25711	,000	5,3627	13,6373
	PAD (20 ppm)	8,96000	1,25711	,000	4,8227	13,0973
	<i>Chenopodium</i> (20 ppm)	10,75333	1,25711	,000	6,6161	14,8906
	<i>Chenopodium</i> (200 ppm)	9,58667	1,25711	,000	5,4494	13,7239

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

**% DE SUPERVIVENCIA DE E.coli**

HSD Tukey<sup>a</sup>

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Chenopodium (20 ppm)	3	.0000	
Chenopodium (200 ppm)	3	1,1667	
OMC (20 ppm)	3	1,2533	
PAD (20 ppm)	3	1,7933	
Chenopodium (2000 ppm)	3		10,7533
Sig.		.626	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.

**Advertencias**

% DE SUPERVIVENCIA DE E.coli es constante cuando SUSTANCIA FOTOPROTECTORA = Chenopodium (20 ppm). Se incluirá en cualquier diagrama de caja generada, pero se omitirá otro resultado.

**Pruebas de normalidad<sup>a</sup>**

	SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% DE SUPERVIVENCIA DE E.coli	OMC (20 ppm)	.226	3	.	.983	3	.751
	PAD (20 ppm)	.311	3	.	.997	3	.378
	Chenopodium (200 ppm)	.363	3	.	.803	3	.121
	Chenopodium (2000 ppm)	.203	3	.	.994	3	.849

a. Corrección de significación de Lilliefors

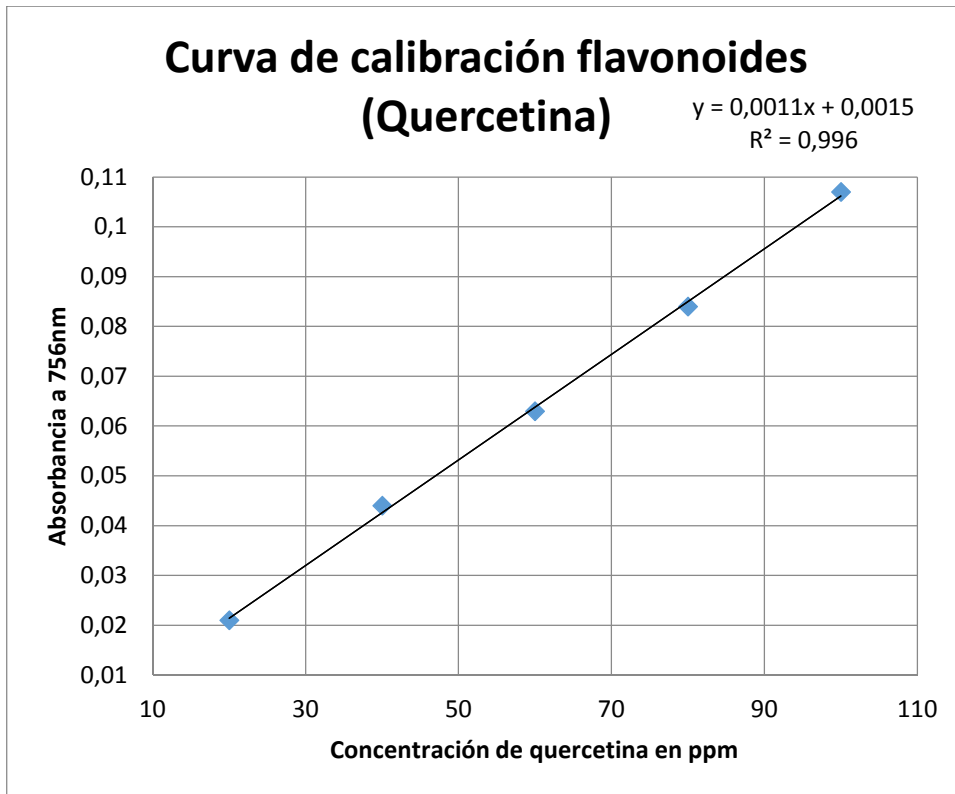
b. % DE SUPERVIVENCIA DE E.coli es constante cuando SUSTANCIA FOTOPROTECTORA = Chenopodium (20 ppm). Se ha omitido.

Fuente: TOBAR, Ángel, 2016

**Anexo F:** Curva de calibración de quercetina para el cálculo de flavonoides totales.

CONCENTRACION PPM	ABSORBANCIA A 756NM
20	0,021
40	0,044
60	0,063
80	0,084
100	0,107

Fuente: TOBAR, Ángel, 2016



Fuente: TOBAR, Ángel, 2016

### Anexo G: Autorización de Investigación Científica otorgada por el MAE.

