



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOTOPROTECTORA,  
GENOTÓXICA Y DE IRRITACIÓN OCULAR *in vitro* DEL  
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Buddleja incana*”**

Trabajo de titulación presentado para optar el grado académico de:

### **BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: VALERIA ALEJANDRA SAMANIEGO FLORES**

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

Riobamba- Ecuador

2018

**© 2018, Valeria Alejandra Samaniego Flores**

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

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El tribunal del trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación “DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOTOPROTECTORA, GENOTÓXICA Y DE IRRITACIÓN OCULAR *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Buddleja incana*”, de responsabilidad de la señorita VALERIA ALEJANDRA SAMANIEGO FLORES, 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 DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Lcda. Karen Acosta, M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Gisela Pilco

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Valeria Alejandra Samaniego Flores soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

VALERIA ALEJANDRA SAMANIEGO FLORES

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de titulación va dedicado a mis padres y hermana por darme todo el apoyo y la fortaleza para cumplir mis metas profesionales.

Valeria

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y la virgen María Auxiliadora por haberme guiado y acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por darme la sabiduría en cada experiencia y aprendizaje de mi vida.

Les doy gracias a mi familia, a mis padres César y Noemí por haberme brindado todo su apoyo, por sus consejos, por todo su amor incondicional, por inculcarme valores y principios y por ser un ejemplo de vida a seguir. A mi hermana Ivett Paola por ser parte importante de mi vida, por llenar mi vida de alegrías y mucho amor y por enseñarme a ser una mujer valiente y a luchar por conseguir mis sueños.

A todos mis amigos por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vida que nunca olvidare, a Jorge por ser parte de mi vida y haberme apoyado en todo momento, y sobre todo por su paciencia y amor incondicional.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser la institución que me ha permitido formarme como profesional. Al grupo de investigación GIPRONAF de manera especial a mi tutor BQF. Diego Vinueza, por brindar su esfuerzo y dedicación a los estudiantes, quien, con sus conocimientos, su paciencia, experiencia, motivación y amistad, ha logrado que pueda adquirir los conocimientos y habilidades necesarias para desarrollarme en un futuro como una buena profesional.

Y por último a todos mis familiares y personas que me han demostrado su amistad, me han brindado su apoyo y ánimo en los momentos difíciles, algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar el lugar donde se encuentren quiero darles las gracias de todo corazón.

Valeria Alejandra Samaniego F.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ABC** área bajo la curva

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**ARN** ácido ribonucleico

**ATCC** American Type culture collection

**CAM-TB** Test de membrana corioalantoidea en huevo de gallina con azul Tripan

**CBC** carcinoma células basales

**CEC** carcinoma de células escamosas

**CPD** dímeros de pirimidina

*E.coli* *Escherichia coli*

**EXA** Agencia Espacial Civil Ecuatoriana

**FPS** Factor de protección solar

**GAE** Equivalentes de ácido gálico

**HET-CAM** Test de membrana corioalantoidea en huevo de gallina

**MED** dosis mínima eritematosa

**mg** miligramos

**min** minutos

**mL** mililitro

**nm** nanómetros

**MNs** micronúcleos

**OECD** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

**OMC** 2-etilhexil-4-metoxicinamato

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**Palmidato-O** octil dimetil PABA

**QE** Equivalentes de quercetina

**Rf** factor de retención

**ROS** Especies reactivas de oxígeno

**UFC** unidades formadoras de colonia

**UV** Ultravioleta

**UVA** Radiación ultravioleta A

**UVB** Radiación ultravioleta B

**UVC** Radiación ultravioleta C

**UVI** Índice ultravioleta

**W/m<sup>2</sup>** Intensidad de radiación

## TABLA DE CONTENIDOS

### Páginas

CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	vii
TABLA DE CONTENIDOS .....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
SUMMARY.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Luz solar.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Radiación ultravioleta.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Tipos de radiación UV.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Factores de los que depende la intensidad de la radiación UV.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Índice ultravioleta.....</b>	<b>8</b>
<b>1.6 Efectos que produce la radiación UV en la salud.....</b>	<b>8</b>
<b>1.7 La piel.....</b>	<b>10</b>
<b>1.7.1 Melanina.....</b>	<b>11</b>

<b>1.7.2</b>	<b><i>Pigmentación de la piel y fototipos cutáneos</i></b> .....	12
<b>1.7.3</b>	<b><i>Respuestas de la piel frente a los rayos UV</i></b> .....	14
<b>1.7.4</b>	<b><i>Fotoenvejecimiento prematuro</i></b> .....	15
<b>1.7.5</b>	<b><i>Radiación UV y cáncer de piel</i></b> .....	15
<b>1.7.6</b>	<b><i>Cáncer de piel en el Ecuador</i></b> .....	18
<b>1.8</b>	<b>Fotoprotección</b> .....	19
<b>1.8.1</b>	<b><i>Factor de protección solar (SPF)</i></b> .....	21
<b>1.8.2</b>	<b><i>Filtros solares</i></b> .....	22
<b>1.8.2.1</b>	<b><i>Filtros químicos</i></b> .....	22
<b>1.8.2.2</b>	<b><i>Filtros físicos</i></b> .....	24
<b>1.8.2.3</b>	<b><i>Filtros biológicos</i></b> .....	25
<b>1.9</b>	<b>Fitoconstituyentes con actividad fotoprotectora</b> .....	26
<b>1.10</b>	<b>Antecedentes de la investigación</b> .....	28
<b>1.11</b>	<b><i>Buddleja incana</i></b> .....	30
<b>1.12</b>	<b>Ensayos <i>in vitro</i> para evaluar la eficacia y seguridad de fotoprotectores a base de productos naturales</b> .....	32
<b>1.12.1</b>	<b><i>Ensayo de Genotoxicidad (test de micronucleos) MNs</i></b> .....	32
<b>1.12.2</b>	<b><i>Ensayos de irritabilidad ocular in vitro</i></b> .....	34
<b>1.12.2.1</b>	<b><i>Test de membrana coriolantoidea en huevo de gallina HET-CAM</i></b> .....	34
<b>1.12.2.2</b>	<b><i>Test de membrana coriolantoidea en huevo de gallina con azul Tripan CAM-TB</i></b> ..	35
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	36
<b>2.1</b>	<b>Lugar de la investigación</b> .....	36
<b>2.2</b>	<b>Recolección de la materia vegetal</b> .....	36
<b>2.3</b>	<b>Identificación botánica y taxonómica</b> .....	36
<b>2.4</b>	<b>Acondicionamiento del material vegetal</b> .....	36

<b>2.5 Control de calidad de la droga cruda</b> .....	37
<b>2.5.1 Determinación del contenido de humedad</b> .....	37
<b>2.5.2 Determinación de cenizas totales</b> .....	37
<b>2.5.3 Determinación de cenizas solubles en agua</b> .....	37
<b>2.5.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</b> .....	39
<b>2.6 Tamizaje fitoquímico</b> .....	39
<b>2.7 Estandarización del extracto</b> .....	41
<b>2.7.1 Determinación de requisitos organolépticos: olor, color, sabor</b> .....	41
<b>2.7.2 Determinación del pH</b> .....	42
<b>2.7.3 Determinación de la densidad relativa</b> .....	42
<b>2.7.4 Determinación del índice de refracción</b> .....	42
<b>2.7.5 Determinación de sólidos totales: método gravimétrico</b> .....	42
<b>2.8 Obtención del extracto seco de <i>Buddleja incana</i></b> .....	43
<b>2.9 Determinación de fenoles totales</b> .....	43
<b>2.10 Determinación del contenido de flavonoides totales</b> .....	44
<b>2.11 Determinación de la capacidad antioxidante</b> .....	45
<b>2.12 Preparación del estándar McFarland</b> .....	46
<b>2.13 Factor de protección solar mediante el método de muerte celular inducida a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b> .....	47
<b>2.14 Determinación del Factor de Protección solar SPF <i>in vitro</i></b> .....	47
<b>2.15 Determinación de la irritabilidad ocular <i>in vitro</i>, método HET-CAM</b> .....	49
<b>2.16 Determinación de la irritabilidad ocular <i>in vitro</i>, método CAM-TB</b> .....	50
<b>2.17 Determinación del potencial de Genotoxicidad (test de micronucleos) MNs</b> .....	51
<b>2.18 Análisis de datos</b> .....	51

### CAPÍTULO III

<b>3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Control de calidad de la droga cruda.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Tamizaje fitoquímico.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3 Estandarización del extracto de <i>Buddleja incana</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4 Obtención del extracto seco de <i>Buddleja incana</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>3.5 Contenido de fenoles totales.....</b>	<b>58</b>
<b>3.6 Contenido de flavonoides.....</b>	<b>60</b>
<b>3.7 Capacidad captadora de radicales libres .....</b>	<b>62</b>
<b>3.8 Control de calidad del Estándar McFarland.....</b>	<b>63</b>
<b>3.9 Factor de protección solar mediante el método de muerte celular inducida a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....</b>	<b>64</b>
<b>3.10 Análisis estadístico.....</b>	<b>70</b>
<b>3.11 Factor de Protección solar SPF <i>in vitro</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>3.12 Irritabilidad ocular <i>in vitro</i>, método HET-CAM.....</b>	<b>73</b>
<b>3.13 Irritabilidad ocular <i>in vitro</i>, método CAM-TBS.....</b>	<b>74</b>
<b>3.14 Potencial de Genotoxicidad test de MNs.....</b>	<b>75</b>
<b>3.15 Análisis estadístico.....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>80</b>

### BIBLIOGRAFÍA

### ANEXOS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Tipos de radiación UV.....	6
<b>Tabla 2-1:</b> Algunos efectos de la radiación UV en la salud humana.....	9
<b>Tabla 3-1:</b> Pigmentación de la piel, la escala de Fitzpatrick y el riesgo de UV.....	13
<b>Tabla 4-1:</b> Propiedades de fotoprotección de agentes naturales.....	20
<b>Tabla 5-1:</b> Categoría del SPF según COLIPA.....	22
<b>Tabla 6-1:</b> Estructuras químicas y grupos cromóforos de filtros solares químicos.....	23
<b>Tabla 7-1:</b> Clasificación científica de <i>Buddleja incana</i> .....	31
<b>Tabla 1-2:</b> Composición de la turbidez estándar de McFarland.....	46
<b>Tabla 2-2:</b> Valores de EE x I preestablecidos.....	48
<b>Tabla 1-3:</b> Resultados de los parámetros de control de calidad de <i>Buddleja incana</i> .....	53
<b>Tabla 2-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico de <i>Buddleja incana</i> .....	55
<b>Tabla 3-3:</b> Resultados de la estandarización del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Buddleja incana</i> .....	57
<b>Tabla 4-3:</b> Absorbancias del estándar de ácido gálico.....	59
<b>Tabla 5-3:</b> Contenido de fenoles totales en las hojas de <i>Buddleja incana</i> .....	59
<b>Tabla 6-3:</b> Absorbancias del estándar de quercetina.....	60
<b>Tabla 7-3:</b> Contenido de flavonoides en las hojas de <i>Buddleja incana</i> .....	61
<b>Tabla 8-3:</b> Actividad antioxidante de las hojas de <i>Buddleja incana</i> .....	62
<b>Tabla 9-3:</b> Absorbancia de los Estándares McFarland.....	64
<b>Tabla 10-3:</b> Efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Buddleja incana</i> .....	64
<b>Tabla 11-3:</b> Efecto fotoprotector del control positivo Palmidato-O .....	65
<b>Tabla 12-3:</b> Efecto fotoprotector del control positivo OMC.....	66
<b>Tabla 13-3:</b> Test ANOVA de un factor para el índice de fotoprotección.....	71
<b>Tabla 14-3:</b> Resultados del Factor de Protección solar <i>in vitro</i> .....	71

<b>Tabla 15-3:</b> Resultados de la determinación de irritabilidad ocular, HET-CAM.....	73
<b>Tabla 16-3:</b> Resultados de la determinación de irritabilidad ocular, CAM-TBS.....	75
<b>Tabla 17-3:</b> Resultados del ensayo del test de micronúcleos .....	76
<b>Tabla 18-3:</b> Test de ANOVA ensayo de genotoxicidad, índice mitótico.....	78
<b>Tabla 19-3:</b> Test de Tukey ensayo de genotoxicidad, índice mitótico.....	78
<b>Tabla 20-3:</b> Test de chi-cuadrado ensayo de genotoxicidad, test micronúcleos.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Categoría de exposición de la radiación UV.....	8
<b>Figura 2-1:</b> Producción de melanina incidencia de rayos UVA-UVB las melaninas.....	11
<b>Figura 3-1:</b> Síntesis de las melaninas.....	12
<b>Figura 4-1:</b> Generación de radicales libres oxidativos por la radiación UV.....	15
<b>Figura 5-1:</b> Carcinoma de células basales.....	16
<b>Figura 6-1:</b> Carcinoma de células escamosas.....	17
<b>Figura 7-1:</b> Melanoma nodular.....	18
<b>Figura 8-1:</b> Tasa de incidencia de cáncer por cada 100.000 hombre en Ecuador 2011-2013...	19
<b>Figura 9-1:</b> Tasa de incidencia de cáncer por cada 100.000 mujeres en Ecuador 2011-2013...	19
<b>Figura10-1:</b> <i>Buddleja incana</i> .....	30
<b>Figura11-1:</b> Formación de núcleos y micronúcleos a partir de una célula madre.....	33
<b>Figura 1-2:</b> Proceso de extracción para realizar el tamizaje fitoquímico .....	40
<b>Figura 2-2:</b> Protocolo a seguir para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.....	40
<b>Figura 3-2:</b> Protocolo a seguir para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico..	41
<b>Figura 4-2:</b> Protocolo a seguir para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.....	41
<b>Figura 1-3:</b> Curva de calibración del ácido gálico.....	59
<b>Figura 2-3:</b> Curva de calibración de quercetina.....	61
<b>Figura 3-3:</b> Curva de calibración del estándar McFarland.....	64
<b>Figura 4-3:</b> Efecto fotoprotector, contra la muerte celular inducida a <i>E. coli</i> por la radiación UVB. Blanco, <i>Buddleja incana</i> 20 ppm, Pamidato 20 ppm, OMC 20 ppm.....	66
<b>Figura 5-3:</b> Efecto fotoprotector, muerte celular inducida a <i>E. coli</i> por la radiación UVB Blanco, <i>Buddleja incana</i> 200 ppm, Pamidato 200 ppm, OMC 200 ppm.....	67
<b>Figura 6-3:</b> Efecto fotoprotector, muerte celular inducida a <i>E. coli</i> por la radiación UVB Blanco, <i>Buddleja incana</i> 2000 ppm, Pamidato 2000 ppm, OMC 2000 ppm.....	68
<b>Figura 7-3:</b> Factor de Protección solar <i>in vitro</i> de <i>Buddleja incana</i> .....	72

**Figura 8-3:** Curva de calibración del colorante azul de Tripán..... 74

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**Anexo A:** Análisis estadístico del efecto fotoprotector *in vitro*

**Anexo B:** Análisis estadístico del ensayo de genotoxicidad

**Anexo C:** evidencias fotográficas del trabajo del trabajo de investigación

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de titulación fue determinar el efecto fotoprotector *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Buddleja incana* a 20, 200 y 2000 ppm de concentración; así como, complementar el estudio con los ensayos de genotoxicidad e irritación ocular. Previamente, se efectuó el acondicionamiento y control de la droga cruda. En el tamizaje fitoquímico fue revelada cualitativamente la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. El extracto fue sometido a ensayos fisicoquímicos con el fin de estandarizarlo, para luego ser concentrado en un evaporador seguido por liofilización. El contenido de flavonoides, fenoles y capacidad antioxidante fueron determinados mediante técnicas espectrofotométricas, así como el FPS *in vitro*, por medio de la ecuación de Mansur. La actividad fotoprotectora se comprobó mediante el método de muerte celular inducida por exposición de *Escherichia coli* (ATCC 25922) a la radiación ultravioleta, el número de UFC sobrevivientes se detectaron en intervalos de 30 minutos durante 3 horas. Para comprobar la irritación ocular *in vitro* del extracto, se usó la prueba de membrana corioalantoidea y su variante que incluye azul tripán como indicador de lesión. El ensayo de genotoxicidad *in vitro* fue realizado sometiendo las raíces de *Vicia faba* al extracto de *B. incana*, para luego observarlas al microscopio e identificar las células en división y aquellas con presencia de micronúcleos como indicadores de genotoxicidad. Los resultados revelan un contenido de fenoles de 27.9 GAE/100 g liofilizado y de flavonoides de 6.5 QE/g. El extracto de *B. incana* presenta un efecto fotoprotector muy similar a los controles etilhexil metoxicinamato y octildimetil-PABA a las mismas concentraciones al comparar el nivel de supervivencia, por medio del análisis estadístico de Tukey del que se concluye que no existe diferencia significativa, alcanzando la supervivencia bacteriana hasta los 90 min. El extracto no presenta signos de genotoxicidad ni irritación ocular en ninguna de las concentraciones evaluadas. Se recomienda identificar estructuralmente los compuestos responsables de la actividad fotoprotectora para su aplicación como nuevos filtros solares.

**PALABRAS CLAVE:** <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOQUÍMICA>, <QUISHUAR (*Buddleja incana*)>, <EXTRACTO SECO>, <FOTOPROTECCIÓN >, <RADIACIÓN UV >, <FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)>, <GENOTÓXICIDAD>, <IRRITACIÓN OCULAR>.

## SUMARY

This dissertation work aims at determining the photoprotective effect *in vitro* of the hydroalcoholic extract of *Buddleja incana* leaves at 20, 200 and 2000 ppm of concentration; as well as, complement the study with the genotoxicity and eye irritation tests. Previously, conditioning and control of the crude drug were effectuated. In phytochemical screening, the presence of phenolic compounds and flavonoids was qualitatively revealed. The extract was subjected to physical-chemical tests to standardize it, to then be concentrated in an evaporator followed by lyophilization. The content of flavonoids, phenols and antioxidant capacity were determined by spectrophotometric techniques, as well as the SPF *in vitro*, through the Mansur equation. The photoprotective activity was checked through the method of cell death induced by exposure of *Escherichia coli* (ATCC 25922) to ultraviolet radiation, the number of UFC survivors was detected at 30-minute intervals during 3 hours. To verify the ocular irritation *in vitro* of the extract, the chorioallantoic membrane test and its variant that includes trypan blue as an indicator of injury were used. The genotoxicity test *in vitro* was carried out by submitting the roots of *Vicia faba* to the extract of *B. incana*, to observe them under a microscope then and identify dividing cells and those with the presence of micronuclei as indicators of genotoxicity. The results disclose the content of phenols of 27.9 GAE / 100 g lyophilized and flavonoids of 6.5 QE / g. The extract of *B. incana* presents a photoprotective effect very similar to the controls ethylhexyl methoxycinnamate and octyl dimethyl-PABA at the same concentrations when comparing the survival level, employing the Tukey statistical analysis from which it is concluded that there is no significant difference, reaching the bacterial survival until 90 min. The extract shows no signs of neither genotoxicity nor eye irritation at any of the tested concentrations. It is recommended to structurally identify the responsible compounds of the photoprotective activity for its application as new sunscreens.

**Key words:** <TECHNOLOGY AND ENGINEERING SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY>, <QUISHUAR (*Buddleja incana*)>, <DRY EXTRACT>, <PHOTOPROTECTION>, <UV RADIATION>, <SUN PROTECTION FACTOR (SPF)>, <GENOTOXICITY>, <OCULAR IRRITATION>

## **Introducción**

El sol es considerado como la estrella más visible desde el planeta Tierra, la energía que emite es fundamental para el desarrollo de la vida; proporciona algunos beneficios, como la producción de vitamina D, el funcionamiento del sistema inmunológico, la modulación de reacciones enzimáticas entre otros; sin embargo, en la actualidad, por la alta intensidad con la que llegan los rayos del sol a la superficie de la Tierra, puede considerarse como una grave amenaza para la salud, principalmente para la piel, al ser el órgano más expuesto al ambiente (González y Castro, 2010: p.10).

El aumento indiscriminado de la contaminación a nivel mundial, generada por el ser humano, ha sido una de las causas principales, que ha conllevado a la degradación acelerada de la capa de ozono, y como consecuencia al aumento de la intensidad de la radiación solar, principalmente en la zona geográfica ecuatorial. El Ecuador al estar ubicado en dicha zona se ve afectado fuertemente por los rayos solares que tienden a incidir de manera directa (López Figueroa, 2011: p.315).

Según la Organización Mundial de la Salud la radiación solar en el ser humano, por sus altos niveles y larga exposición, representa un potencial de riesgo para la población, y es el factor más importante para la incidencia de lesiones malignas, cáncer de piel, diversos tipos de ceguera y debilitamiento del sistema inmunológico a mediano o largo plazo, en la población a nivel mundial (OMS, 2003: pp. 1-3).

La radiación ultravioleta interactúa con las células de la piel; causando un daño extenso, que conlleva desde enfermedades degenerativas, hasta incluso cáncer; como resultado del estrés oxidativo, producto de la generación abundante de radicales libres, que destruyen el material genético de las células. La radiación UVB causa la mayor parte de lesiones cutáneas, y es considerada de 1000 a 100 000 veces más cancerígena que la UVA (Romanhole et al., 2015: pp.367-368).

La elevada exposición principalmente a los rayos UVB reducen la capacidad de defensa de las enzimas antioxidantes, inducen un estrés oxidativo, detección del ciclo celular, fotoenvejecimiento prematuro y cáncer en la piel (Gilaberte & González, 2010: pp. 660-661).

Según la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA) en su informe Hyperion del 28 de enero 2009, afirma con un 95 % de confiabilidad que en el territorio ecuatoriano los niveles de radiación ultravioleta en la Costa superan los 18 UVI, mientras que para la región sierra superan los 22 UVI, siendo considerando estos índices un potencial riesgo. La (OMS) en conjunto con la

Organización Meteorológica Mundial (OMM) indican que el máximo tolerable para la exposición humana es de 11 UVI (EXA, 2009).

En un reporte actual de noviembre del 2017, el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (Inamhi) comunicó que las ciudades andinas de Riobamba y Latacunga registrarán los índices de radiación ultravioleta (UV) muy altos, alcanzando un pico de 13 puntos (Maisache, 2017).

En el Ecuador, de acuerdo a cifras de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (Solca), el cáncer de piel manifestado en sus principales formas como carcinoma de células basales (CBC), carcinoma de células escamosas (CEC) y melanoma, va en un continuo aumento, con una incidencia del 40,7 % de los casos en hombres, y un 37,5 % en mujeres. (SOLCA Quito, 2017).

Al evidenciar las graves consecuencias que puede traer a mediano o largo plazo la incidencia de la radiación solar en el Ecuador, como resultado de la ubicación geográfica y el debilitamiento de la capa de ozono, el siguiente trabajo de investigación se enfoca en la búsqueda de alternativas naturales que ayuden a proteger a la población de las radiaciones solares.

En los vegetales, uno de los mecanismos de defensa identificados frente a la radiación UV, es la producción de compuestos polifenólicos, dentro de los cuales el grupo más característico son los flavonoides. Diversas investigaciones correlacionan el aumento de la producción de flavonoides cuando la planta está bajo estas condiciones de estrés ambiental (Carrasco, 2009: pp.59-60).

Es así que, tomando como base el estudio de Ávila Acevedo y colaboradores, se pretende hallar metabolitos útiles con actividad fotoprotectora, en *Buddleja incana*, planta nativa de nuestra región, que se encuentra a grandes alturas y por tanto recibe mayor incidencia de radiación solar, dicha investigación es viable, ya que se cuenta con todas las técnicas, equipos y materiales necesarios (Avila Acevedo et al. 2005).

Los flavonoides compuestos presentes en las plantas, poseen diversas actividades biológicas, especialmente actividades antimicrobianas, antioxidantes y fotoprotectoras, en la actualidad los extractos activos ricos en flavonoides se han convertido en un componente importante para el descubrimiento de nuevas moléculas activas para la fotoprotección humana (Costa et al., 2015: p.413).

Esta actividad fotoprotectora se debe, a que varios metabolitos secundarios presentan similitud estructural con los filtros químicos, que los hace susceptibles a la absorción de radiación en la región ultravioleta hasta de un 90 %, con la diferencia que estos actúan únicamente formando una película externa que refleja o dispersa la radiación y la emite en forma de calor, sin causar efectos adversos como lo hacen los filtros químicos incorporados en fotoprotectores convencionales (Costa et al., 2015: p. 414 ).

Es así que; para el desarrollo del proyecto se siguieron los lineamientos y metodologías establecidos en fuentes bibliográficas, y partiendo de estudios realizados previamente por la comunidad científica, se pretende aportar al desarrollo efectivo dirigido a mejorar la salud de la población y, en consecuencia, su calidad de vida, dando cumplimiento a lo estipulado en el objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir (Secretaría Nacional de Planificación y desarrollo Ecuador, sf).

Es trascendental buscar una solución temprana al problema, ya que de lo contrario podrían ser la causa de un mayor número de secuelas y un aumento desmedido de personas afectadas de cáncer de piel u otras complicaciones como dermatitis irritativa, disrupción hormonal (estrogénica y androgénica) que generada por la absorción de los compuestos químicos incluidos en las formulaciones de bloqueadores solares y productos cosméticos para la protección de la piel (Costa et al., 2015:pp.413-415).

Esta investigación representa un importante aporte para nuestra sociedad ya que la intensidad de los rayos solares en nuestro país es muy significativa, generando un mayor riesgo en la población ecuatoriana de padecer problemas de la piel, principalmente en zonas de mayor altura como es la región Sierra (Mena et al., 2010).

Por ello, se pretende evaluar la actividad fotoprotectora *in vitro* mediante el método de muerte celular inducida sobre *E. coli* ATCC 25922, metodología establecida por J.G. Ávila Acevedo, en su estudio de fotoprotección con *Buddleja scordioides*, estableciéndose así un estudio base, para el desarrollo futuro de formulaciones de protección solar, que se apliquen a la comunidad (Avila Acevedo et al., 2005: pp.301-309).

Además, se pretende evaluar la toxicidad de la planta y su seguridad del extracto mediante ensayos *in vitro* de genotoxicidad, test de micronúcleos e irritación ocular y el test de membrana corioalantoidea en huevo de gallina, con el fin de garantizar la utilización del extracto de *Buddleja incana* en protectores solares y productos cosméticos (Reis Mansur et al. 2016:pp.251).

Este trabajo de investigación se lo desarrolló en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las actividades fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* \_Quishuar.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comprobar la calidad de la planta, así como del extracto mediante ensayos físicoquímicos.
- Establecer cualitativamente la presencia de los metabolitos secundarios presentes en *Buddleja incana*, por medio del tamizaje fitoquímico.
- Determinar, mediante espectrofotometría la cantidad de flavonoides, fenoles totales, y la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*.
- Evaluar el efecto protector del extracto mediante el ensayo de muerte celular inducida sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 por exposición a radiación UV.
- Definir el Factor de Protección Solar *in vitro* del extracto hidroalcohólico por espectrofotometría utilizando la ecuación de Mansur.
- Determinar la capacidad del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* para inducir irritación ocular mediante la prueba de irritación sobre membrana corioalantoidea.
- Determinar la genotoxicidad del extracto mediante el ensayo de micronúcleos en *Vicia faba* variedad minor.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Luz solar

La luz solar o radiación solar, se la define como la energía que trasfiere el sol hasta una superficie, dicha energía tiene la capacidad de viajar en forma de ondas; que liberan energía cuando colisionan con un objeto. Esta reacción se da gracias a sus propiedades eléctricas y magnéticas, conocidas como ondas electromagnéticas, que van desde los rayos cósmicos, rayos gamma, rayos X, rayos UV, rayos visibles e infrarrojos (Abal, n.d :pp.1-7).

Dichas radiaciones sufren importantes modificaciones por su paso a través de la atmósfera y únicamente dos tercios de la misma logran llegar a la superficie de la Tierra, en forma de radiaciones ultravioleta: UVB (0.3%), UVA (5.1%), radiaciones visibles (62.7%) e infrarroja, (31.9%); las cuales son esenciales para llevar a cabo los procesos metabólicos en varios organismos vivos (González et al., 2009 : p.70).

### 1.2 Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (UV) constituye parte de las radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol, con longitudes de onda que van de 100 a 400 nm, estableciéndose como la parte más energética del espectro electromagnético, que logra llegar a la superficie terrestre. En cantidades moderadas la radiación UV es beneficiosa para la salud, ya que ayuda a la producción de vitamina D, en varias especies contribuye en los procesos fotosintéticos. Sin embargo, una exposición excesiva causa alteraciones en el normal funcionamiento de varios sistemas biológicos (OMS, 2016).

Tres longitudes de onda diferentes forman la radiación UV: la UVA (315-400 nm), la UVB (280-315) y la UVC (100-280 nm), esta última presenta la energía más alta; no obstante, es absorbida por la capa de ozono en la atmosfera; mientras que las radiaciones UVA y UVB logran penetrar la capa de ozono y llegan a la superficie terrestre, en un 95% y 5% respectivamente, siendo considerada la UVB un mayor factor riesgo ya que contribuyen cerca del 80% de los efectos

daños que se asocian a su exposición, mientras que la UVA produce el 20% restante (Vargas et al., 2013).

Cuando la piel se somete a la exposición de la radiación UV, parte de ésta es absorbida, reflejada o se trasmite a diferentes capas de células, hasta que el fotón incidente se disipa. La cantidad de luz que se absorbe hacia los tejidos es la más importante ya que se trata de energía que puede causar daño, en dependencia del tipo de piel, la intensidad de la radiación o la cantidad de tiempo de exposición (López y NevotI, 2006: pp. 25-26).

Una exposición excesiva tanto a los rayos UVA como UVB se relaciona con desarrollo de eritema, edema, quemaduras, hiperplasia, daños en el ADN, fotoenvejecimiento prematuro, cáncer cutáneo, cataratas y otras enfermedades oculares. Estas alteraciones pueden estar directamente relacionadas con los niveles de radiación que logran llegar a la piel; siendo así, que en un 70 % la radiación UVB llega al estrato corneo en la epidermis, mientras que la UVA es absorbida por las células de la dermis en un 70 a 80 % (González Púmariega et al., 2009: pp. 70-71).

### 1.3 Tipos de radiación UV.

La radiación UV se divide de acuerdo a su longitud de onda, cuando mayor sea ésta, menor energía presentará.

**Tabla 1-1.** Tipos de radiación UV

TIPO DE RADIACIÓN UV	LONGITUD DE ONDA	CARACTERÍSTICAS
UVA	315- 400 nm	<p>Los rayos UVA inducen daño tisular a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Wang, Osterwalder y Jung 2011)</p> <p>Están clasificados como "carcinogénicos para los humanos" por la OMS; y se ha relacionado con el 67% de los melanomas malignos.</p> <p>Genera foto-envejecimiento, caracterizado por la presencia de fibras elásticas anormales en la dermis y por una disminución de los diferentes tipos de colágeno.</p> <p>La mayor parte de las cámaras bronceadoras emiten este tipo de rayos, porque son las causantes del aumento de cáncer de piel.</p>
		<p>Se considera como la "radiación de quemaduras". Es capaz de penetrar solamente hasta la epidermis y actúa principalmente en la capa basal.</p>

<b>UVB</b>	280- 315 nm	Es causante de efectos adversos tanto directos como indirectos como la formación de fotoproductos, estimulación de la síntesis de ADN, detención del ciclo celular, fotoenvejecimiento, fotocarcinogénesis de tipo escamoso y carcinoma de células basales, daño en los ojos y en la piel produciendo eritemas solares. (enrojecimiento). Son los responsables de la disminución de la capacidad de defensa del sistema inmunológico, como consecuencia de la reducción en los niveles de enzimas antioxidantes en la piel. Se caracteriza porque tiene mayor capacidad de producir daño genotóxico y quemadura solar.
<b>UVC</b>	100-280 nm	Tiene más energía que los otros tipos de rayos UV, pero no logra pasar por la capa de ozono atmosférica y por tanto no son normalmente la causa de problema para la piel.

Fuente: (González Púmariega et al., 2009: pp.70-72).

#### 1.4 Factores de los que depende la intensidad de la radiación UV

Entre los principales factores que afectan la intensidad con la que llegar los rayos UV, se encuentran:

- **Latitud.** – depende de la elevación del sol, cuando más cerca de la línea ecuatorial más intensa es la radiación UV.
- **Nubosidad.** – la intensidad de la radiación aumenta cuando no hay nubes, pero puede incluso ser alta con su presencia, ya que algunos tipos de nubes tienen la capacidad de reflejar y aumentar la intensidad total de la radiación, por lo tanto, un cielo nublado no garantiza el bloqueo total de los rayos UV.
- **Reflejo en las superficies.** – los rayos UV tienen la capacidad de reflejar o dispersar la radiación en diferentes tipos de superficies como la nieve que refleja en un 80%, la arena en un 15%, así como en otras superficies como el pavimento o la hierba.
- **Altitud.** – a medida que aumenta la altura la atmosfera es más delgada, y por tanto es capaz de absorber menor cantidad de radiación UV. Con el incremento de altitud (por cada 1000 metros), la intensidad de la radiación va en aumento del 10 al 12%.
- **Ozono.** – el ozono tiene la capacidad de absorber parte la radiación UV, que podría llegar a la superficie terrestre, la concentración de este podría variar a lo largo del año y del día (OMS, 2003: pp.2-3).

## 1.5 Índice ultravioleta.

El índice UV solar mundial, corresponde a una medida de la intensidad de la radiación solar UV que llega a la superficie de la tierra, y es capaz de iniciar el eritema o enrojecimiento de la piel; dicho índice se expresa como un valor mayor a cero, y cuanto más alto sea, mayor es la probabilidad de producir lesiones cutáneas y oculares. (OMS, 2003: pp.4-5)

Este índice es calculado mediante un modelo matemático, en el cual se relaciona la intensidad de la radiación solar en la superficie terrestre, con la concentración de ozono pronosticado, la cantidad de nubosidad que se espera y la elevación de la superficie; dicho índice tiende a variar a lo largo del día y indica la nocividad con la que pueden llegar los rayos UV a la piel (US EPA, 2017).

Según la OMS, el pronóstico del índice ultravioleta es de suma importancia para aumentar la conciencia en la población sobre los riesgos excesivos que puede producir la radiación UV y además advierte a las personas la necesidad de adoptar las medidas de protección necesarias, con el único objetivo de reducir los efectos perjudiciales para la salud y por ende los costos de atención en salud. El IUV se divide en rangos de exposición (figura 1-1)(OMS, 2016, p.4).

**Figura 1-1:** Categoría de exposición de la radiación UV

CATEGORÍA DE EXPOSICIÓN	INTERVALO DE VALORES DEL IUV
<b>BAJA</b>	<b>&lt; 2</b>
<b>MODERADA</b>	<b>3 A 5</b>
<b>ALTA</b>	<b>6 A 7</b>
<b>MUY ALTA</b>	<b>8 A 10</b>
<b>EXTREMADAMENTE ALTA</b>	<b>11+</b>

Fuente: (OMS,2003)

## 1.6 Efectos que produce la radiación UV en la salud

La radiación UV emitida por el sol, en cantidades moderadas presenta varios efectos positivos para la salud de la población, permite la síntesis de vitamina D, la cual tiene acción antirraquítica y previene la osteoporosis, estimula la protección hormonal, promueve la generación de las células de la piel, ayuda a la circulación sanguínea y estimula la producción de neurotransmisores que son los responsables del estado de ánimo de las personas (Maske et al., 2013)

Sin embargo, una exposición excesiva a la radiación trae consigo un sin número de efectos secundarios, dando lugar a efectos tanto agudos como crónicos, afectando especialmente a la piel y a los ojos que son aquellos órganos más expuestos a la radiación, entre los efectos agudos se destaca el eritema, quemaduras en la piel, fotoconjuntivitis, fotoqueratitis; mientras que los efectos crónicos van desde el fotoenvejecimiento prematuro hasta cáncer de piel y cataratas. (Reyes y Vitale, 2013: pp.236- 237).

Estos problemas de salud están relacionados directamente con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales desempeña funciones positivas *in vivo*, ya que se relacionan con la producción de energía, la fagocitosis, la regulación del crecimiento celular y la señalización intercelular. Cuando los mecanismos de defensa están desequilibrados, la piel podría ser afectada ser afectada por el aumento de ROS, causando estrés oxidativo con deterioro de las membranas celulares, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos promoviendo su oxidación (Reis Mansur et al., 2016: p. 252).

La radiación UVA se caracteriza por causar necrosis en las células endoteliales, altera las estructuras de las fibras de colágeno y elastina, acelerando el envejecimiento de la piel. Tiene la capacidad de penetrar hasta la dermis e incluso es capaz de causar daño en los vasos sanguíneos, en la estructura del ADN y en el sistema inmunológico, desencadenando en la formación de cáncer, esta se relaciona con el 67 % de los melanomas malignos (González Púmariega et al., 2009: p.71)

La radiación UVB es conocida como la radiación de quemaduras, tiene la capacidad de producir quemadura solar y daño genotóxico mil veces mayor, esta llega únicamente a la epidermis actuando sobre la capa basal de las células, dañando a los queratinocitos, produce efectos biológicos como la formación de fotoproductos, estimulación de la síntesis de ADN, deterioro del ciclo celular, disminuye los niveles de enzimas antioxidantes y se considera que es la responsable de inducir cáncer de tipo escamoso y carcinoma de células basales (González Púmariega et al., 2009: pp.71-72).

**Tabla 2-1:** Algunos efectos de la radiación UV en la salud humana

	<b>Efectos de la radiación UV en la salud humana</b>
<b>Piel</b>	Melanoma maligno Quemaduras solares Daño crónico de la piel Fotodermatitis

<b>Ojos</b>	Fotoconjuntivitis Cáncer de cornea Cataratas Melanoma uveal ocular Retinopatía solar aguda
<b>Sistema inmunitario</b>	Aumento de susceptibilidad de infecciones Deterioro de inmunización profiláctica Activación de infección por el virus latente

**Fuente:** (Hernández, Morera y Wright, nd)

## 1.7 La piel

La piel constituye el órgano que reviste nuestro cuerpo, brinda una protección de barrera con el medio externo, disminuye las pérdidas hídricas y de temperatura, y protege de la radiación UV y algunos agentes infecciosos. Está constituida por una capa más externa, denominada epidermis, conformada por tejido epitelial, a medida que estas células van madurando desde la base hacia la periferia, se transforman en células que conforman el estrato córneo de la piel. Las células más abundantes de la epidermis son los queratinocitos, juegan un papel importante en la expresión de citoqueratinas, formación de desmosomas y uniones estrechas para formar una barrera fisicoquímica muy efectiva (Losquadro, 2017: p.283).

La dermis se encuentra entre la epidermis y la hipodermis, es responsable de la variación regional en el espesor de la piel. Está compuesta principalmente de colágeno, pero también contiene elastina, vasos sanguíneos, nervios y glándulas sudoríparas. Las células primarias que forman la dermis son los fibroblastos responsables de la producción de colágeno, elastina y otras proteínas. La dermis también contiene abundantes células inmunes y fibroblastos, que participan activamente en muchas respuestas fisiológicas en la piel (D’Orazio et al., 2013:pp. 12222-12248).

Próxima a la dermis, formando la capa más profunda se encuentra la hipodermis, o tejido celular subcutáneo, rico en tejido adiposo, separado por tabiques fibrosos. Este tejido se caracteriza por poseer adipocitos y es pobremente irrigado es decir contiene muy pocos vasos sanguíneos (Franco, 2003: pp.130-131).

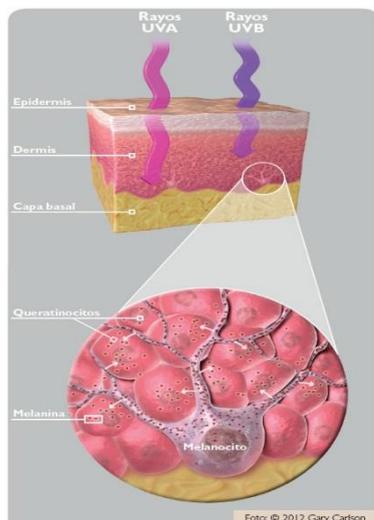
Los queratinocitos a más de crear una barrera física, acumulan pigmentos de melanina, la cual funciona para bloquear de manera potente la penetración de la luz ultravioleta en la piel. Aunque los queratinocitos epidérmicos contengan abundante melanina, no se fabrica en estas células, ya

que la síntesis de melanina se limita a los melanocitos que constituyen las segundas células más abundantes de la epidermis y la única fuente de pigmento en la piel (Schmidt, 2013:pp.308-313).

La melanina es la única fuente de pigmento en la piel y cabello, puede tener muchos otros efectos fisiológicos importantes, incluyendo influencias reguladoras sobre la homeostasis epidérmica, la eliminación de radicales libres para proteger contra la lesión oxidativa y posiblemente incluso la actividad antimicrobiana (D’Orazio et al., 2013 pp. 12222-12248).

Las ondas intensas y cortas de radiación UVB estimulan a los orgánulos conocidos como melanosomas a producir melanina, la cual es absorbida por los queratinocitos; mientras que las ondas más largas, correspondientes a la radiación UVA penetra más profundamente en la piel, y reacciona con la melanina dándole un tono café. (figura 2-1) (Schmidt, 2013:pp.308-313).

**Figura 2-1:** Producción de melanina incidencia de rayos UVA-UVB



**Fuente:** Schmidt, 2013: p.308

### ***1.7.1 Melanina***

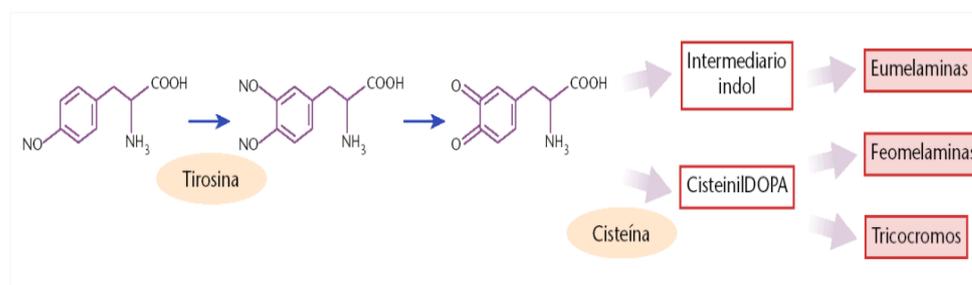
La cantidad y el tipo de melanina epidérmica es el principal factor que determina la naturaleza de la piel y la sensibilidad a los rayos UV. La melanina está compuesta por subunidades de diferentes especies de pigmentos formadas por oxidación y ciclación del aminoácido tirosina. Hay dos formas químicas principales de melanina, la eumelanina, de color pardo o negro, contienen azufre, es un pigmento oscuro expresado con abundancia en la piel de individuos muy pigmentados, y la feomelanina, pigmentos amarillos o rojo-parduscos resultantes de la incorporación de cisteínas, que integran mayor proporción de azufre que la eumelanina (Marín y del Pozo, n.d.: pp. 116-118).

La eumelanina es mucho más eficaz en el bloqueo de los rayos UV que la feomelanina, por lo tanto, cuanto más eumelanina en la piel, menos permeable a los rayos UV es la epidermis. Las personas de piel clara casi siempre son sensibles a los rayos UV y tienen un alto riesgo de cáncer de piel tienen muy poca eumelanina epidérmica y, por ende, reciben mucha más radiación UV que las personas de piel más oscura (Marín y del Pozo, n.d. pp. 116-118).

De hecho, los niveles de feomelanina son similares entre las personas de piel oscura y de piel clara, y es la cantidad de eumelanina epidérmica la que determina la coloración de la piel, la sensibilidad a los rayos UV y el riesgo de cáncer. Los datos sugieren que la feomelanina puede promover la lesión oxidativa del ADN y la melanomagénesis al generar radicales libres en los melanocitos incluso en ausencia de rayos UV (D'Orazio et al. 2013).

La síntesis de melanina tiene lugar en los feomelanosomas y eumelanosomas, a partir de la tirosina, la cual mediante una sucesión de oxidaciones catalizadas por la tirosinasa conducen a la síntesis de DOPA (dihidroxifenilalanina), para a continuación producir un intermediario la dopaquinona, y a partir de este se conducen dos vías distintas para la formación de las feomelaminas y eumelaminas.(figura 3-1) (Marín y del Pozo, n.d. pp. 116-118)

**Figura 3.1:** Síntesis de las melaninas



**Fuente:** (Marín & del Pozo, n.d. pp. 116-118)

### 1.7.2 Pigmentación de la piel y fototipos cutáneos

El tipo de la piel, es uno de los factores más importantes para determinar el riesgo de cáncer de piel y la sensibilidad a los rayos UV. La piel presenta diferente capacidad de adaptación frente a la radiación emitida por el sol, y el conjunto de características que establecen si la piel se broncea o no y en qué grado lo hace, es conocido como fototipo cutáneo. Las personas con un fototipo de piel I y II enfrentar mayor riesgo de cáncer de piel que aquellas con fototipos V y VI (Maddodi, et al, 2012: pp. 1075 - 1082).

Fitzpatrick clasifico a los diferentes tipos de piel en los denominados fototipos cutáneos de acuerdo a la "Escala de Fitzpatrick" que corresponde a una escala semicuantitativa, que describen

el color de la piel, nivel de melanina, respuesta inflamatoria a los rayos UV y el riesgo de cáncer, expresando en seis fototipos (Ravnbak, 2010: p: B4153).

La dosis mínima eritematosa (MED) es un método cuantitativo que informa la cantidad de radiación UV (particularmente UVB) necesaria para inducir quemaduras solares en la piel 24-48 horas después de la exposición determinando el eritema (enrojecimiento) y el edema (hinchazón) =. Cuanto más blanca es la piel, más fácil es que los rayos UV causen inflamación (quemaduras solares). MED, por lo tanto, es más alta en personas de piel oscura ya que se necesita más radiación UV para "quemar" la piel rica en eumelanina. El fototipo de Fitzpatrick bajo se correlaciona tanto con MED como con melanoma y otro riesgo de cáncer de piel (D’Orazio et al., 2013: pp. 12222-12248).

**Tablas 3-1:** Pigmentación de la piel, la escala de Fitzpatrick y el riesgo de UV.

<b>Fototipo de Fitzpatrick</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Eumelanina epidérmica</b>	<b>Respuesta cutánea a los rayos ultravioleta</b>	<b>MED (mJ / cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Riesgo de cáncer</b>
I	La piel es de color blanco brillante Ojos azules o verdes	+/-	Piel que se quema siempre y no se broncea nunca	15-30	++++
II	La piel blanca. Ojos azules, avellana o marrones. Cabello rojo, rubio o castaño	+	Se quema casi siempre y se broncea mínimamente	25-40	+++ / ++++
III	Piel ligeramente morena Ojos marrones Cabello oscuro	++	Se quema fácilmente y se broncea de forma gradual	30-50	+++
IV	Piel marrón claro Ojos oscuros Cabello oscuro	+++	Se quema mínimamente y se broncea siempre fácil e intensamente.	40-60	++
V	Piel expuesta es marrón Ojos oscuros Cabello oscuro	++++	En esta piel el eritema pasa casi inadvertido y el bronceado es muy intenso y persistente	60-90	+
VI	La piel expuesta es negra.	+++++	No se queman y cuyo bronceado es máximo.	90-150	+/-

Fuente: (D’Orazio et al. 2013) (González Bosquet, 2010.)

### ***1.7.3 Respuestas de la piel frente a los rayos UV***

La radiación ultravioleta produce diferentes efectos en el normal funcionamiento de la piel, algunas ocurren de manera retardada mientras que otras de manera aguda, uno de los efectos agudos producidos por la radiación es la inducción de la inflamación con la producción de una cascada de citoquinas, mediadores vasoactivos y neuroactivos en la piel, que en su conjunto dan como resultado inflamación, con la consiguiente generación de quemaduras solares. Si la dosis UV excede el umbral de daño, los queratinocitos inician la apoptosis y mueren, dichas células son conocidas como "células de quemaduras solares" (D'Orazio et al., 2013 pp. 12222-12248).

El daño celular causado por la radiación UV, conduce a la activación del gen p53, alterando significativamente la fisiología de los queratinocitos, y por ende la detección del ciclo celular, el ADN activa una reparación e induce la apoptosis cuando el daño es muy grande. Sin embargo, varias horas después de la exposición a la luz ultravioleta y a las señales de respuesta, al daño disminuye y los queratinocitos proliferan, mediados por varios factores de crecimiento epidérmicos, su acumulación aumenta el grosor de la epidermis (hiperqueratosis) (López Camarillo et al., 2012; pp.142-143).

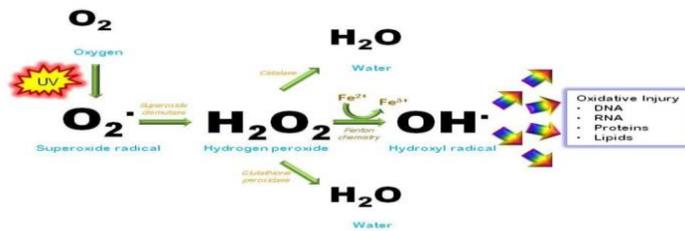
Otra respuesta producida por la piel es la melanización adaptativa, más conocida como bronceado, la radiación UV regula la producción y acumulación de melanina, esta respuesta fisiológica va a proteger a la piel contra el daño posterior a los rayos UV, y los defectos que pueda producirse en esta vía se relacionan con la susceptibilidad de un individuo a generar cáncer (Maddodi, Jayanthi y Setaluri 2012).

La radiación UVB, es un potente estimulador de la inflamación y la formación de lesiones del ADN, por la formación de enlaces covalentes entre moléculas de timina (dímeros de timina mutagénica), dímeros de pirimidina (CPD) y otros protoproductos tales como los dímeros de citidina y citidina-timidina. Mientras que los UVA son mucho menos activos, pero es considerado un potente impulsor del daño oxidativo de los radicales libres al ADN, tanto los rayos UVA como UVB pueden contribuir a la carcinogénesis a través de diferentes mecanismos (D'Orazio et al. 2013).

Además de inducir la formación de fotodímeros, la radiación UV causa mutaciones al generar ROS como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, los cuales atacan macromoléculas como proteínas, lípidos, ARN, ADN, alterando su estructura e interfiriendo en su función. (figura 4-1). Los nucleótidos son muy susceptibles a la lesión causada por radicales

libres, y la oxidación de sus bases promueven el emparejamiento incorrecto lo cual es causa de mutagénesis (D'Orazio et al. 2013).

**Figura 4-1:** Generación de radicales libres oxidativos por la radiación UV.



Fuente: (D'Orazio et al., 2013)

### 1.7.4 Fotoenvejecimiento prematuro

El fotoenvejecimiento implica cambios en la apariencia y funciones de la piel, como producto de una exposición solar prolongada y repetida, en este complejo proceso interactúan varios elementos incluyendo metaloproteinasas, citosinas, ROS y mediadores de la inflamación sobre varias estructuras celulares cutáneas principalmente en el tejido conectivo provocando degradación del colágeno y elastina, intensa sequedad, arrugas definidas, flacidez entre otras (Navas y Navas, 2017: pp. 22-25)

Los cambios más significativos del fotoenvejecimiento se presentan en la dermis, y se caracteriza por la presencia de material basófilo en la dermis superficial y media, fenómeno conocido como elastosis. Estos cambios epidérmicos requieren la movilización de la matriz extracelular, colágeno y elastina, lo cual es efectuado por la metaloproteinasas, cuya actividad se ve influenciada por la radiación UV. Los fibroblastos son las células clave de todos estos cambios (Gilaberte y González, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno, durante la radiación solar, cumplen varias funciones como; modifican las proteínas, alteran los lípidos, dañan el ADN, aumentan los depósitos de elastina en la dermis, inducen las síntesis de metaloproteinasas, y en general dirige las interacciones que conducen al fotoenvejecimiento prematuro (Gilaberte y González, 2010).

### 1.7.5 Radiación UV y cáncer de piel

El cáncer de piel, representa el tipo de cáncer más frecuente, corresponde a un crecimiento incontrolado de células anormales en la piel, cuyo principal factor causal es la acumulación de mutaciones no reparadas en el ADN, desencadenando mutaciones o defectos genéticos principalmente en el gen supresor de tumores p53, su causa más frecuente se da por la radiación

ultravioleta o las cámaras de bronceado, que hacen que las células de la piel comiencen a multiplicarse rápidamente y formen tumores malignos (Conic et al., 2018:pp. 40-46).

Según datos epidemiológicos, se relacionan todas las formas de cáncer de piel con la exposición a los rayos UV y se estima que estos son causantes de casi el 90% de los cánceres de piel no melanoma, CBC y CEC, mientras que el melanoma maligno presenta un porcentaje muy pequeño, sin embargo, es el responsable de la mayoría de muertes asociadas al cáncer de piel (Schmidt, 2013: pp.25-32).

Los cánceres de piel se agrupan en dos categorías principales, melanoma que corresponde al nombre genérico de los tumores melánicos o pigmentados y cánceres de piel no melanoma, llamado así porque se originan en células que no acumulan pigmento. El riesgo de cáncer de piel está influenciado directamente por la exposición a los rayos UV y por la pigmentación de la piel (Mohan y Chang, 2014:pp. 40-46.e7).

Las personas con piel clara, es decir con niveles bajos de melanina, muestran fenotipos muy sensibles a los rayos UV, los cuales tienden a quemarse en lugar de broncearse; las mutaciones que contribuyen a una tez blanca y deterioro del bronceado, específicamente a los defectos de señalización en el receptor melanocortina 1 (MC1R), se asocian con una reparación menos eficiente del ADN en los melanocitos, es así que un individuo con MC1R defectuoso no solo sufre de dosis altas de radiación porque su piel es menos capaz de bloquear los rayos UV, si no que pueden acumular un mayor número de mutaciones debido a una reparación defectuosa en el ADN. (D’Orazio et al. 2013)

El carcinoma de células basales corresponde a la forma más frecuente de cáncer de piel, se origina a partir de las células epidérmicas pluripotenciales de la capa basal, y es menos frecuente a partir de los anexos cutáneos, en pacientes inmunodeprimidos y con síndromes genéticos, existe una mayor predisposición de desarrollar este tipo de carcinoma, aproximadamente el 80% de los tumores se desarrollan en sitios expuestos como el cuello y la cabeza, es un tumor de lento crecimiento y aparecen como llagas abiertas, manchas rojas, crecimientos rosados, protuberancias brillantes o cicatrices (figura 5-1) (Mohan y Chang, 2014:pp. 40-46.e7).

**Figura 5-1:** Carcinoma de células basales



**Fuente:** Craythorne & Al-Niami, 2017

El carcinoma espinocelular es un tumor maligno, tiene sus orígenes a partir de los queratinocitos escamosos en la epidermis de la piel o membranas mucosas, los pacientes que presentan un mayor riesgo de desarrollar, incluyen los inmunodeprimidos, aquellos con riesgo de inmunosupresión crónica (receptores de donantes de órganos), en condiciones de cicatrización crónica (lupus eritematoso, úlceras en las piernas, quemaduras). Las lesiones se presentan como pápulas costrosas, nódulos ulcerados (Figura 5-1) o verrugosos (Craythorne y Al-Niami, 2017)

**Figura 6-1:** Carcinoma de células escamosas



**Fuente:** Craythorne & Al-Niami, 2017

Más de 1 millón de casos de carcinoma de células escamosas se diagnostican cada año en los EE. UU. Y (según diferentes estimaciones) hasta 8,800 personas mueren a causa de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad ha aumentado hasta un 200 por ciento en las últimas tres décadas en los Estados Unidos (Guy et al., 2015 pp: 45).

El melanoma maligno es la forma más peligrosa de cáncer de piel, estos crecimientos cancerosos se desarrollan cuando el daño es irreparable en el ADN, se origina a partir de los melanocitos de las capas basales de la epidemis, este tipo de tumores tienen la capacidad de diseminarse desde los vasos linfáticos hacia la vía sanguínea, por lo que su control resulta extremadamente difícil (López-NevotI 2006).

Los melanomas a menudo se parecen a los lunares, presenta una coloración negra y marrón, pero también pueden ser de color piel, rojos, púrpura, azul o blanco. El melanoma mata anualmente a aproximadamente 10.130 personas en los EE. UU. (Mohan y Chang, 2014:pp. 40-46.e7).

Si el melanoma es reconocido y tratado temprano, casi siempre es curable, pero si no lo es, el cáncer puede avanzar y propagarse a otras partes del cuerpo, donde se vuelve difícil de tratar y puede ser fatal. Si bien no es el más común de los cánceres de piel, causa la mayoría de las muertes. En 2016, se estima que 76,380 de estos serán melanomas invasivos, con aproximadamente 46,870 en hombres y 29,510 en mujeres (Mohan y Chang, 2014:pp. 40-46.e7).

**Figura 7-1:** Melanoma nodular



**Fuente:** Craythorne & Al-Niami, 2017

Entre los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de melanoma tenemos:

- La principal causa de riesgo es en poblaciones de piel clara la presencia de numerosos (lunares) atípicos.
- Los melanomas son más habituales en las personas de tez clara, ojos azules y pelo pelirrojo o rubio.
- Una exposición alta e intermitente a la radiación UV solar.
- La incidencia de melanoma en la población blanca generalmente aumenta conforme disminuye la latitud, siendo la incidencia más alta la registrada en Australia.
- El riesgo de melanoma es mayor en personas con antecedentes de cánceres de piel no melánicos y queratosis actínica, ambos indicadores de la exposición acumulada a la radiación UV (OMS, 2016).

#### ***1.7.6 Cáncer de piel en el Ecuador***

En el Ecuador el cáncer es un problema creciente de salud pública, constituye la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y en mujeres de 30 a 64 años de edad, constituye la primera causa de muerte. En 1980 el cáncer presentó un porcentaje del 6%, mientras que para el 2016 esta cifra se incrementó en un 16% según el INEC; para el 2020 se espera diagnosticar 31.420 casos nuevos de cáncer en todo el país. (SOLCA [n.d]).

Según estadísticas publicadas por SOLCA, cada año se presentan 650 casos nuevos de cáncer de piel, por lo que su incidencia se va incrementado significativamente, es así que en mujeres es la tercera causa más frecuente de cáncer, mientras que en hombre se encuentra en segundo lugar, luego del cáncer de próstata, se cree que la principal causa son los altos índices de radiación ultravioleta que llegan al país en los últimos años (Molineros Daniel 2017).

En el Ecuador, no hay disponibilidad de estadísticas actuales en cuanto a casos de cáncer de piel; sin embargo, según el Registro Nacional de Tumores, de la Sociedad de lucha contra el Cáncer

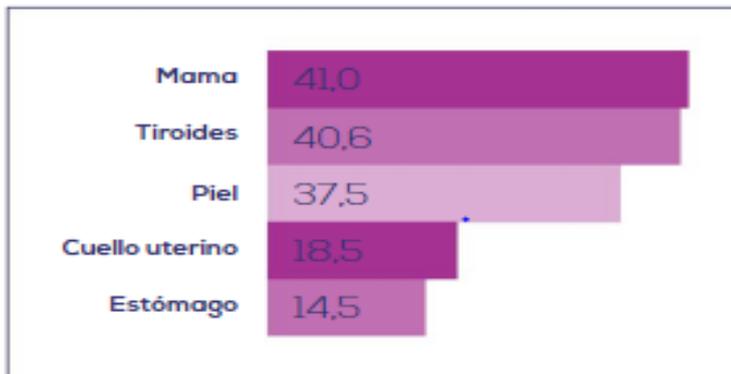
núcleo de Quito, en sus datos más actuales presenta estadísticas oficiales de cáncer del país, siendo el cáncer de próstata el más frecuente en hombres con una tasa de incidencia del 66.7 %, seguido por el de piel con un 40,7 %. En mujeres, se reporta una incidencia del 37,5 %, este incremento se debe en gran parte al mejoramiento en su diagnóstico. (SOLCA, 2017:pp.10-11)

**Figura 8-1:** Tasa de incidencia de cáncer por cada 100.000 hombre en Ecuador 2011-2013



**Fuente:** Sociedad de lucha contra el cáncer (SOLCA Quito). 2017.

**Figura 9-1:** Tasa de incidencia de cáncer por cada 100.000 mujeres en Ecuador 2011-2013



**Fuente:** Sociedad de lucha contra el cáncer (SOLCA Quito). 2017

## 1.8 Fotoprotección

El principal objetivo de la fotoprotección es prevenir el daño que ocurre en la piel como producto de una exposición a la radiación UV, es una estrategia preventiva y fundamental frente al cáncer de piel y al fotoenvejecimiento prematuro, una de las estrategias más actuales en fotoprotección pretende reparar el ADN del daño solar. (Gilaberte y González, 2010: pp.659)

La piel tiene varios mecanismos de protección y defensa, cuya eficacia varía según los individuos, siendo los más afectados aquellos de fototipos claros. Para reducir dichos daños, se han desarrollado estrategias de fotoprotección que se basan en reducir el tiempo de exposición solar, cubrirse con ropa adecuada, llevar gafas y complementar lo anterior aplicando fotoprotectores con un factor de protección solar (FPS) 15 o superior (Gilaberte y González, 2010: pp.271).

En la actualidad existen diferentes tipos de fotoprotectores, entre los agentes fotoprotectores naturales tenemos los siguientes (tabla 4-1)

**Tabla 4-1:** Propiedades de fotoprotección de agentes naturales

<b>AGENTE</b>	<b>FOTOPROTECCIÓN</b>
Ozono	Atenúa toda la luz UVC emitida por el sol, el 90% de la luz UVB y una atenuación mínima o nula en la luz solar UVA.
Latitud y altitud	La transmisión de luz UVB disminuye en un 3% por cada aumento de grado en la latitud. Por cada 1000 pies de aumento en la elevación, hay un aumento de 4% a 10% de la luz UVB que llega a la superficie de la tierra.
Hora del día y estación	La luz UVB es más fuerte desde las 10 a.m. hasta las 2 p.m. La luz UVA es relativamente constante durante el día.
Contaminantes	Se pueden producir reducciones significativas en la radiación UVB con polvo, cenizas volcánicas y aerosoles. La nieve, el hielo, la arena, el vidrio y el metal pueden reflejar hasta el 85% de la luz UVB
Sombra	Los paraguas brindan poca protección contra la luz ultravioleta.
Agua	Los nadadores pueden obtener radiaciones UV significativas porque penetra hasta una profundidad de 60 cm sin atenuación significativa.
Espesor de la piel	La piel humana absorbe la radiación UVB, dispersa la mayoría de luz visible y refleja del 5% al 10% de toda la radiación solar desde 250 nm hasta 3000 nm
Melanina	Hay una penetración cinco veces más baja de UVA a través de la epidermis de piel oscura en comparación con la de las personas de piel clara. La epidermis de la piel oscura tiene un SPF intrínseco de 13.4, mientras que la piel clara tiene un SPF de 3.3.

Fuente: Al-Jamal, Griffith, & Lim, 2014: pp. 22-29

Es aconsejable tomar medidas de fotoprotección a todas las edades, de manera especial en la infancia y la adolescencia, ya que las quemaduras producidas en estas etapas, constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma en la vida adulta. (Cestari y Buster, 2017:pp.110).

### ***1.8.1 Factor de protección solar (SPF)***

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), estandarizó la definición de factor de protección solar y adoptó dicha prueba como un estándar de oro para determinar cuantitativamente la fotoprotección eritemogénica de un producto. Según la FDA, comprende la relación numérica entre la dosis mínima de eritema (MED) de la piel protegida por  $2 \text{ mg/cm}^2$  del producto analizado y la MED de la piel desprotegida después de la exposición a una dosis determinada de radiación solar estandarizada (Al-Jamal et al., 2014: pp.22-29).

El SPF, también se lo define como el número de veces que el fotoprotector aumenta la capacidad de defensa de la piel frente al enrojecimiento o eritema previo a la quemadura, esta definición indica únicamente la capacidad de protección frente al eritema y no a otros efectos producidos por la radiación. Cuando más alto es SPF, más alta es la protección de la piel frente a los rayos solares (Arellano et al., 2017:p. 92).

Un filtro solar con SPF 15, en términos de porcentaje, bloquea aproximadamente el 93% de los rayos UVB, en comparación con uno con SPF 30 que protege contra más del 97%; mientras que uno con SPF 50 impide el paso de los rayos UVB más del 98%, pueden parecer diferencias sin significancia, pero para personas con una piel sensible a la luz o antecedentes de cáncer, estos porcentajes altos marcan la diferencia, sin embargo ningún fotoprotector tiene la capacidad de bloquear el 100 % de los rayos UV (skincancer Foundation 2012).

Existen diferentes métodos para determinar el SPF, en dependencia del país donde dónde se fabriquen los fotoprotectores, así tenemos el método de la FDA o americano, DIN o alemán, SAA o australiano y COLIPA o europeo; siendo este último el más aceptado, aunque su aplicación no es obligatoria, es ampliamente utilizado por ser un método perfectamente estandarizado (Arellano et al., 2017:p. 92).

En función del SPF, Colipa clasifica a los productos en varios tipos o categorías (tabla 5-1).

**Tabla 5-1:** Categoría del SPF según COLIPA.

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

Fuente: (Bendová et al. 2007)

### ***1.8.2 Filtros solares***

Los filtros solares se han convertido con el paso de los años, en los productos más utilizados como barreras contra los rayos UV, su uso cotidiano ha demostrado una reducción significativa en el desarrollo del fotoenvejecimiento prematuro y cáncer de piel, son sustancias que contienen moléculas o complejos moleculares, que tienen la capacidad de reflejar, absorber o dispersar una parte de los fotones de la radiación solar, con una mayor o menor eficacia (Korać y Khambholja, 2011: pp.165-167)

Un filtro solar para ser considerado eficaz debe cumplir varias condiciones, debe ser seguro es decir no producir reacciones de sensibilidad o toxicidad; debe ser estable frente a los agentes externos como el aire, humedad, luz, pH de la piel; debe ser compatible con los componentes de la formulación, como con la superficie cutánea y debe responder ante un amplio espectro de la radiación (Jallad, 2017:pp.356-359).

En función de su mecanismo de acción y composición, los filtros solares se agrupan en dos grupos, los filtros físicos y químicos, hoy en día se incorporan además los filtros biológicos, entre los cuales se encuentran las sustancias antioxidantes (Asociación Argentina de Dermatología, c2013).

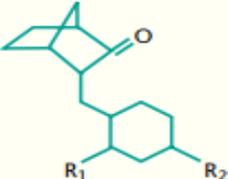
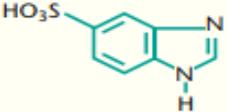
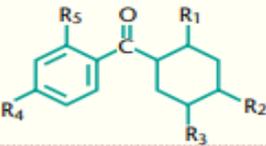
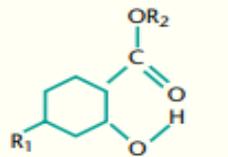
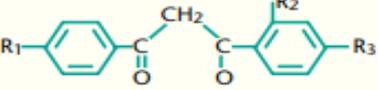
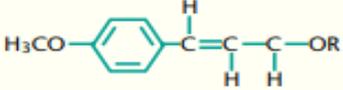
#### ***1.8.2.1 Filtros químicos***

Los filtros químicos también conocidos como filtros orgánicos, se caracterizan por absorber la radiación UV a través de su estructura de anillo aromático de estructura conjugada, la energía absorbida, es emitida nuevamente como radiación térmica, la mayoría de filtros químicos bloquean una región específica de la luz ultravioleta, por lo que la gran parte de bloqueadores solares químicos incorporan varios filtros en su formulación y en dependencia de la longitud de

onda absorbida, estos se clasifican en filtros UVB, UVA y de amplio espectro (Korać y Khambholja, 2011:pp.356-359).

Al presentar estos filtros la capacidad de absorberse en la piel, se presenta el riesgo de intolerancia, por lo que no es recomendable su aplicación en niños, pieles sensibles o lesionadas como cicatrices, quemaduras, tratamiento posláser, o pieles intolerantes (Marín y del Pozo [sin fecha]).

**Tabla 6-1:** Estructuras químicas y grupos cromóforos de los filtros solares químicos

Filtros químicos	Grupo cromóforo
Acrilatos	
Derivados de los benzimidazoles	
Derivados de las benzofenonas	
Derivados de los salicilatos	
Derivados del dibenzoilmetano	
Ésteres cinamatos	

Fuente: (Marín y del Pozo, n.d.-b)

- **Filtros químicos UVB**

Estos filtros tienen la capacidad de absorber la luz UV de 305-310 nm. Entre los filtros más utilizados se encuentran los derivados de cinamatos, el ácido p-aminobenzoico (PABA), benzimidazoles, derivados del bencilidenalcanfor, estos bloquean de forma eficaz hasta un 90% de la radiación UV y son capaces de proteger frente al eritema y la quemadura inducidos por la radiación (Korać y Khambholja, 2011).

En muchos de estos filtros químicos utilizados en productos de protección solar, no se han establecido un uso seguro para el ser humano a largo plazo, y varias investigaciones recientes sugieren un sin número de afecciones que puede traer para la salud, como para el medioambiente (Jallad, 2017:pp.356-359).

Aminobenzoato como el PABA, fueron los primeros compuestos en ser utilizados, no son solubles y tienen la capacidad de unirse a los queratinocitos por puentes de hidrógeno, su uso fue limitado debido a los constantes problemas cutáneos que presentaba como alergia de contacto, mediante pruebas *in vitro* se demostró que era cancerígeno, ya que contribuye a la liberación de radicales libres de oxígeno y por lo tanto tiene un límite de incorporación en las formulaciones y es aconsejable evitar su uso (Reyes y Vitale, 2013).

Los cinamatos (octinoxato y cinoxatos) son compuestos muy resistentes al agua, y fueron los que reemplazaron al PABA, presentan una potencia irritativa muy baja y son incompatible con la ovobenzofenona un filtro UVA, son muy utilizados en EE.UU. porque se ha comprobado que no producen irritación cutánea, sin embargo, presentan un impacto muy grande en los ecosistemas marinos ya que su acumulación tiende a degradar gran parte de la fauna marina (Reyes y Vitale, 2013).

Los salicilatos (Octisalatos, Homosalatos y la Trolamina salicilato) son sustancias muy seguras y estables, absorben pobremente la radiación UVB, por lo que, para alcanzar un factor de protección solar deseado, se requieren de concentraciones muy altas, al no penetrar el estrato corneo presentan una respuesta sensibilizadora baja, lo que les confiere interés galénico como solventes de otros ingredientes (Asociación Argentina de Dermatología. et al. 2013).

- **Filtros químicos UVA**

Entre los filtros orgánicos más utilizados frente a la radiación UVA, tenemos las benzofenonas, son cetonas aromáticas con un amplio espectro de acción, la oxibenzona es una de las benzofenonas más usadas a nivel mundial, son altamente inestable y producen reacciones fotoalérgicas, como la dermatitis de contacto; además se ha evidenciado en modelos animales que es el causante de la disrupción hormonal; otro filtro químico que proporciona una protección en el rango UVA muy extensa es la avobenzona, es foto inestable tras una hora de aplicación reduce su eficacia en un 50-60%, por lo que se le incorpora otras sustancias como la oxibenzona, dietilhexil 2,6-naftalato, para alcanzar una estabilidad frente a los rayos UV (Vallejo et al. , 2010).

### ***1.8.2.2 Filtros físicos***

Los filtros físicos corresponden a moléculas de naturaleza inorgánica, son partículas minerales micronizadas que actúan, reflejando, dispersando o absorbiendo la radiación, la micronización

hace que estos filtros ofrezcan un amplio espectro de acción, además que son resistentes al agua y fotoestables, lo que reduce el riesgo de sensibilización y bajo potencial alérgico (Asociación Argentina de Dermatología et al., 2013).

Entre los filtros físicos que más se destacan tenemos el óxido de cinc (ZnO), dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y la mica, estos brindan protección tanto contra los rayos UVA como UVB, siendo el primero el que confiere una mayor protección contra los rayos UVA, y el segundo frente a los rayos UVB; suelen ser formulados en conjunto con los filtros químicos, en concentraciones que van del 3 al 10%, y rara vez causan irritaciones, por lo que son diariamente incorporados en formulaciones para personas con piel sensible y niños (Korać y Khambholja, 2011).

La mayor desventaja que presentan este tipo de filtros es que al ser más refractivo, causan el fenómeno llamado de blanqueamiento cuando se aplican sobre la piel, además su aplicación es más difícil, por lo que afecta seriamente la eficacia de los productos y la estética, pero con la llegada de las nano-partículas (10-50 nm) de titanio y zinc se ha corregido dicha desventaja (Reyes y Vitale, 2013).

Estos filtros al ser formulados como nano-partículas tienden a ser más reactivas, generando un impacto tanto ambiental como en la salud de sus consumidores, ya que se ha visto un aumento de iones Zn en la sangre y orina de humanos expuestos a productos con filtros solares que contienen nano-partículas de ZnO, durante su exposición a través de una piel sana. En cuanto al impacto ambiental se ha determinado que las nano partículas de ZnO al quedar retenidas en los océanos y mareas causan una hiperproducción de peróxido de hidrogeno, cambiando el equilibrio de los nutrientes especialmente de los fosfatos, lo cual genera un desequilibrio en el fitoplancton marino, que forma la base a la cada alimentaria marina (Jallad, 2017: pp. 353-357).

### ***1.8.2.3 Filtros biológicos***

Los filtros biológicos comprenden principalmente aquellas sustancias antioxidantes, que evitan la formación de radicales libres, actúan frente a la radiación que es capaz de atravesar la piel. Con mayor frecuencia son utilizadas en fotoprotectores, principalmente en forma de vitaminas A (betacarotenos), C y E (en forma de acetato o palmitato) (Korać y Khambholja, 2011).

Estas vitaminas han demostrado que, mediante su aplicación tópica, presenta propiedades antirradicales y actúan contra el envejecimiento y los cánceres de piel fotoinducidos, que se forman como consecuencia de la exposición prolongada al sol. La combinación tanto de filtros UVA, UVB como antioxidantes dan lugar a preparados de elevada eficacia y de amplio espectro de protección solar (Marín y del Pozo, n.d.).

Hoy en día, hay una gran tendencia en la utilización de componentes naturales para proteger a la piel contra los rayos UV, entre los productos que tienen la capacidad de absorber la radiación tenemos el escualeno, los péptidos, nucleótidos que han protegido a la piel de muchos mamíferos durante años. Una alta concentración de péptidos vegetales protege los enlaces peptídicos de las proteínas que forman la piel (Korać y Khambholja, 2011).

El alto índice de escualeno lípido proveniente del aceite de oliva, protege los lípidos más sensibles de la piel, la alantoina es un nucleótido que proviene de la planta conocida comúnmente como lengua de vaca se usa por sus propiedades curativas, calmantes y anti irritantes, este nucleótido tiene la capacidad de absorber la radiación UV que daña el ADN de las células. Actualmente el extracto de esta planta ya es incorporado en productos para el cuidado de la piel, productos antiacné (Asociación Argentina de Dermatología. et al. 2013).

La aplicación tópica de sustancias con potencial antioxidante puede modular las vías de señalización relacionadas con ROS inducidas por la exposición a UV-B, dando como resultado una disminución de la peroxidación lipídica intracelular, aumento de la capacidad antioxidante endógena y el aumento en la viabilidad celular. Por lo tanto, para proteger la piel contra las consecuencias a largo plazo del fotodaño generado por ROS, se necesitan nuevos materiales para la protección de la piel contra la radiación UV-B (Mishra, et al. 2012: pp. 669-683)

En los últimos años, los compuestos naturales han surgido con considerable interés, como agentes fotoprotectores para reducir los daños en la piel inducidos por la radiación UV, por lo general, las plantas y los extractos de las mismas tienen un alto papel protector predominante debido a sus antioxidantes como (vitamina C, vitamina E), flavonoides y ácidos fenólicos, su mecanismo de acción es prevenir el daño oxidativo que se generan las membranas células de los queratinocitos (Rodrigues et al. 2016).

### **1.9. Fitoconstituyentes con actividad fotoprotectora.**

El uso de fotoprotectores activos es muy beneficioso para combatir los efectos nocivos de los rayos UV. Las categorías importantes de fitoconstituyentes beneficiosos incluyen ácidos fenólicos, flavonoides y polifenoles de alto peso molecular (Asociación Argentina de Dermatología. et al. 2013).

Los ácidos fenólicos naturales incluyen ácido hidroxicinámico y ácido hidroxibenzoico. Los polifenoles de alto peso molecular, también conocidos como taninos, incluyen polímeros condensados de catequinas o epicatequinas y polímeros hidrolizables de ácido gálico o elágico. Muchos flavonoides, como la quercetina, la luteolina y las catequinas, son mejores antioxidantes

que el ácido ascórbico, alfa-tocoferol y betacaroteno. Otros fitoconstituyentes fotoprotectores incluyen la curcumina, los compuestos de ajo cafeico y ácido ferúlico, apigenina, genisteína, resveratrol, ácido nordihidroguayarático, ácido carnósico, la silimarina, entre otros (Saraf y Kaur, 2010).

- **Antocianinas**

Las antocianidinas y sus derivados, protegen contra una variedad de oxidantes a través de una serie de mecanismos. Se ha descubierto que las cianidinas, "funcionan como un potente antioxidante *in vivo*" en estudios recientes en animales japoneses (Tsuda, Kato y Osawa 2000). Son capaces de proteger los lípidos de la membrana celular de la oxidación por una variedad de sustancias nocivas, neutralizan las enzimas que destruyen el tejido conectivo. Estudios en animales confirman que la cianidina es un antioxidante cuatro veces más potente que la vitamina E (Korać y Khambholja, 2011).

- **Proantocianidina**

Funcionan como un inhibidor de la mutación del ADN, bloquea la elastasa, mantiene la integridad de la elastina en la piel y actúa de forma sinérgica con la vitamina C y E. Se ha investigado y demostrado que en forma de crema es efectiva contra los efectos peligrosos del sol (rayos UV).

En un estudio, las proantocianidinas en semilla de uva, ejercieron un efecto antioxidante protegiendo diferentes ácidos grasos poliinsaturados de la peroxidación lipídica inducida por la luz UV, además en ensayos sobre ratones, disminuyó el tamaño de los tumores cutáneos expuestos a radiación UV cancerígena (The Netherlands: i.BioCeuticals, 2011).

- **Resveratrol**

Pertenece a una clase de compuestos polifenólicos llamados estilbenos, es un compuesto liposoluble que actúa como antioxidante y antimutagénico; en estudios se ha demostrado que inhibe el desarrollo de lesiones y la tumorigénesis en un modelo de cáncer de piel de ratón (Saraf y Kaur, 2010:pp. 1–11).

La aplicación tópica de resveratrol en ratones antes de la irradiación UVB produjo una disminución significativa en la generación de ROS y la inhibición del edema de la piel. Los estudios a largo plazo han demostrado que la aplicación tópica con resveratrol da como resultado la inhibición de la incidencia de tumores inducidos por UVB y el retraso en el inicio de la tumorigénesis cutánea (Saraf y Kaur, 2010:pp. 1–11.).

- **Quercetina**

Pertenece a los flavonoles, tiene efectos antiinflamatorios y antioxidantes y actúa como un inmunomodulador. Se ha informado que una dieta rica en quercetina inhibe la formación de tumores cutáneos en tres modelos de carcinogénesis cutánea en ratones cuando se administra por aplicación tópica. La quercetina y la rutina se probaron como posibles factores tópicos de protección solar en seres humanos y se encontró que proporcionan protección tanto en el rango UVA como UVB (Choquenet, et al., 2008:p. 1117).

- **Apigenina**

Es un flavonoide, se descubrió que la apigenina es efectiva en la prevención de la carcinogénesis cutánea inducida por UVA / UVB en ratones, en ensayos realizados con *Calendula officinalis* se determinó, mediante la prueba de oreja de ratón, que los flavonoides eran responsables de la actividad y, de estos, la apigenina era más activa que la indometacina. *Artemisia inculta* y *Cuminum cyminum* también contienen apigenina y luteolina que han demostrado actividad antiinflamatoria cuando se usa bajo las condiciones adecuadas (Choquenet, et al., 2008:p. 1117).

- **Silimarina**

La silimarina es un compuesto flavonoide formada por silibina, silidianina y silicristina. La silibina es el metabolito más activo. La silimarina tópica ha demostrado tener un notable efecto antitumoral. El número de tumores inducidos en la piel de ratones sin pelo por la luz UVB se redujo en un 92%. La silimarina reduce la formación de células solares y la apoptosis inducida por la radiación ultravioleta. El resultado no estuvo relacionado con un efecto de protección solar y un mecanismo antioxidante puede ser responsable. El tratamiento con silimarina previene la supresión inmune inducida por UVB y el estrés oxidativo *in vivo* (Saraf y Kaur, 2010:pp. 1–11).

## **1.10 Antecedentes de la investigación**

El uso tradicional de plantas en medicamentos y cosméticos, hoy en día constituye la base para investigaciones y nuevas tendencias, por su alto potencial, es así que a continuación se recopilan varios estudios realizados tanto *in vitro* o *in vivo* para valorar la actividad fotoprotectora en diferentes especies (Benavides N. 2011).

Ávila Acevedo y colaboradores en su estudio de fotoprotección, *in vitro* establecen que existe una correlación entre el extracto metanólico de las hojas de *Buddleja scordioides* y su efecto fotoprotector, esto lo atribuyen a los compuestos verbascósido y linarin, que dicho extracto

presenta, al absorber la radiación UV-B, mostrando además, que el compuesto verbascósido tiene una mejor calidad de protección que los otros compuestos, esto podría ser atribuido a su buen coeficiente de extinción y a sus propiedades antioxidantes (Avila Acevedo et al., 2005).

Estudios realizados anteriormente con *Buddleja incana* implantan que dicha especie posee actividad antioxidante comprobada, atribuida a la presencia de polifenoles, flavonoides, por otra parte, investigaciones con especies del género *Buddleja* en extractos hidroalcohólicos y acuosos, dan evidencia de su fuerte actividad antioxidante, asociado al poder cicatrizante en heridas de la piel y el proceso inflamatorio (Benavides N. 2011) (Letelier M. et al. 2006).

Estudios recientes han demostraron que debido a la radiación UV, se produce una difusión lisosómica, con la consecuente liberación de hierro aumentando el desequilibrio redox. Por lo tanto, una posible ruta para proteger las células del daño de los rayos UV sería proteger los lisosomas. En un trabajo reciente se ha demostrado que los flavonoides epicatequina y su epicatequina metilada son capaces de proteger a estos orgánulos y evitar la liberación intracelular de hierro (Rodrigues et al., 2016:p.334).

Un estudio realizado en el extracto acuoso de *Vigna angularis* una planta nativa de Japón, dio como resultado que esta planta previene el envejecimiento cutáneo es decir suprime su rugosidad, engrosamiento, sequedad y arrugas, al estimular la síntesis de colágeno y elastina, gracias a los bioflavonoides, y compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, especialmente la rutina que es capaz de regenerar la vitamina C después de que neutralice un radical, la vitamina C juega un papel crítico en la fabricación de colágeno, un componente importante de las paredes de los capilares, así como el marco de soporte de la epidermis (Hwang et al., 2014: pp.1339).

Los frutos de *Spondias purpurea* comúnmente conocidos como ciruelas, son una fuente natural importante de compuestos fenólicos como los taninos, los ácidos fenólicos y los flavonoides, según un estudio publicado para evaluar su actividad fotoprotectora se muestra que las cascarras de este fruto, son efectivos contra los rayos UVB y UVA, por su capacidad para absorber la radiación, así como para combatir los efectos nocivos producidos por las ROS, gracias al contenido de dicaffeoil-glucosa, rutina y quercetina, encontrados (Silva et al , 2016:pp.509-514).

En una revisión científica realizada con el extracto de la planta *Polypodium leucotomos* (helecho) muestra que es una planta rica en polifenoles, con propiedades antioxidantes. En dosis de 7,5 mg/Kg. protege la piel, reduciendo el eritema y la depleción de células de Langerhans. Es protectora frente a las reacciones fototóxicas y los cambios histológicos y pigmentarios inducidos por los UVA (Dinkova-Kostova, 2008: pp. 1548-1559).

En otra revisión científica con la misma planta se establece que *Polypodium leucotomos* evita la peroxidación causada por la radiación UV, al inhibir la propagación de las reacciones de cadena

en la peroxidación lipídica, además se ha visto que es capaz de depurar ROS como el anión superóxido, los radicales hidroxilos, los oxígenos asilados y el peróxido de hidrógeno, mediante una inhibición de la enzima  $COX-2$ . Ejerce un efecto citoprotector frente al daño solar, incrementando la supervivencia celular, al inhibir la inducción de óxido nítrico sintetasa, expresión del factor de necrosis tumoral alfa y la apoptosis. (Asociación Argentina de Dermatología. et al. 2013)

### 1.11 *Buddleja incana*

Esta especie es un arbusto grande que crece en la región andina central de Ecuador, Colombia, Venezuela, Bolivia y Chile, su rango de distribución varía entre 1400-4200 metros de altura, en formación de bosque seco a subhúmedo (Reynel C,2009:pp.40-45).

En el Ecuador se conoce comúnmente como *quishuar* y las hojas se usan para tratar heridas infectadas. En Bolivia una infusión de las hojas es útil para tratar la neuralgia, el catarro y como un lavado para heridas, mientras que en Chile se cita su uso para el tratamiento de úlceras y verrugas callosas, mediante una decocción de las hojas y las flores (Houghton, 1984:pp. 293-308).

**Figura 10-1:** *Buddleja incana*



**Fuente:** Reynel C,2009:pp.40

- **Clasificación científica**

**Tabla 7-1:** Clasificación científica de *Buddleja incana*.

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Orden</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Scrophulariaceae</i>
<b>Genero</b>	<i>Buddleja</i>
<b>Especie</b>	<i>Buddleja incana</i>

**Fuente:** (Teopicos Ruíz & Pavón [sin fecha])

- **Descripción botánica**

*Buddleja incana*, nativa del Ecuador, es un arbusto, que por lo general no supera los 12 m de altura, con un diámetro de 20-50 cm y de tronco robusto; sus hojas simples, alargadas y lanceoladas miden de 10 a 30 cm, son gruesas, de color verde claro u oscuro, el envés de las hojas de color blanquecino, densamente cubierta de pelos diminutos que le dan un aspecto afelpado y suave al tacto, con un borde finamente dentado (Reynel C,2009:pp.40-45).

Las flores son pequeñas, hermafroditas de aproximadamente 5-7 mm de longitud, agrupadas en racimos, sus pétalos varían de amarillo a naranja, y forman un tubo corto con 4 estambres y 1 pistilo, su floración se da en los meses de mayo a septiembre, sus frutos tienen forma de drupa o baya blanda, su fructificación se da en los meses de junio y agosto (Villarpando y Villalobos, 2011:pp.30-31)

- **Composición química**

Los glucósidos flavonoides e iridoides son los principales metabolitos secundarios aislados que se presentan en todo el género *Buddleja* (Houghton 1984).

Según Ávila y colaboradores en su estudio realizado sobre *Buddleja*, han identificado algunos metabolitos secundarios como, iridoides, flavonoides, saponinas, triterpenoides, alcaloides en pequeñas cantidades. Los iridoides como la aucubina, flavonoides y terpenoides han demostrado tener actividad antiinflamatoria, presentando además actividad antioxidante atribuida a la presencia de compuestos fenólicos y terpenoides, mientras que su actividad anti fúngica la han

atribuido a sesquiterpenos presentes en la corteza y raíces de este género (Avila A. y Romo de Vivar, 2002:pp. 1003-1005)

En el estudio correspondiente a la evaluación de la actividad fotoprotectora de *Buddleja scordioides*, se establece que el extracto metanólico de dicha planta contiene metabolitos secundarios como compuestos verbascósido (FPS  $24\pm 0.7$ ), linarin (FPS  $5\pm 0.3$ ) y flavonoides (FPS  $5\pm 0.8$ ), los cuales hacen que la actividad fotoprotectora contra las radiaciones UVA Y UVB sea muy significativa (Avila Acevedo et al. 2005a).

### **1.12 Ensayos *in vitro* para evaluar la eficacia y seguridad de fotoprotectores a base de productos naturales**

Muchas pruebas *in vitro* están disponibles para evaluar la eficacia y seguridad tanto de extractos crudos como de las formulaciones, uno de los métodos más aceptados es el Método espectrofotométrico, la prueba de Colipa que se realiza para evaluar la eficacia de las formulaciones, a través de la determinación del factor de protección solar (SPF) y la evaluación del factor de protección UVA. Mientras que para la evaluación de la seguridad *in vitro*, se encuentran las pruebas del HET-CAM, CAM-TBS y genotoxicidad.(Reis Mansur et al., 2016:pp.251)

Las nuevas sustancias requieren una evaluación toxicológica adecuada antes del consumo humano, especialmente aquellas sustancias que se usan a diario. De acuerdo con la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA), dependiendo de la particularidad de cada producto químico o natural, se requieren varios puntos finales toxicológicos tales como irritación ocular, sensibilización de la piel y potencial genotóxico. (ANVISA 2012)

Para los productos de la piel expuestos a la luz solar, como fotoprotectores, es necesario realizar ensayos adicionales, ya que son productos que entran en contacto directo con las mucosas y son de uso diario, sin embargo, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y el Comité de Coordinación Interinstitucional sobre el uso y validación exitosos de los métodos de Refinamiento, Reemplazo y Reducción (3R) no recomienda el uso de animales de laboratorio sino la validación mediante métodos alternativos y reproducibles (Ávila et al., 2017:p.83).

#### **1.12.1 Ensayo de Genotoxicidad (test de micronúcleos) MNs**

Los estudios de genotoxicidad tienen gran importancia, ya que se encargan del estudio de la unidad fundamental de la herencia de toda célula, por esto, y considerando que muchos compuestos químicos de uso personal pueden resultar genotóxicos, en la actualidad se ha

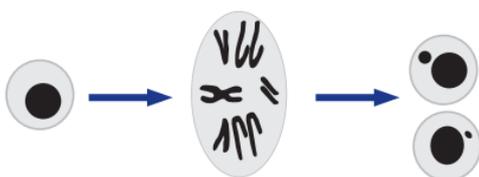
incrementado el interés por conocer el impacto que estas generan en la salud. Es así que el test de micronúcleos (MNs) por su alta sensibilidad, sencillez de evaluación y facilidad de realización se ha convertido en la prueba más utilizada y recomendada por Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos y OECD (Antonio T. Araujo Soto 2015).

La genotoxicidad es la capacidad relativa que tiene un agente físico, químico o biológico de producir un daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos en los seres vivos, el daño en el material genético se produce en el ADN y en aquellos componentes celulares que están relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de las células como las proteínas y el ARN (OECD, 2016:pp.1-2).

El test de micronúcleos *in vitro*, constituye una prueba útil para la detección de micronúcleos en el citoplasma de células interfásicas. Los micronúcleos pueden originarse a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos (es decir, que carecen de un centrómero), o cromosomas completos que no pueden migrar a los polos durante la etapa de anafase de la división celular. El ensayo detecta la actividad de sustancias de prueba clastogénicas (fragmentos de cromosomas procedentes de su ruptura) y aneuogénicas (Los cromosomas enteros que no migraron durante la anafase) en células que han sufrido división celular durante o después de la exposición a la sustancia de prueba (OECD, 2016:pp.1-2)

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas conocidos, en el campo de la hematología, como cuerpos de Howell-Jolly. Su forma es generalmente ovalada o redonda, con un diámetro que va desde 0.4 a 1.6 micras. Su formación ocurre en la anafase de la mitosis (García-Bores et al., 2017:p.74).

**Figura 11-1:** Formación de núcleos y micronúcleos a partir de una célula madre.



**Fuente:** (Iqbal, 2016:pp. 785-802).

Entre las plantas superiores, *V. faba* es considerado como un excelente modelo genético para la vigilancia de la toxicidad ya que, ofrece detección de daños en el ADN o anomalías en la división celular. La planta *V. faba* se usa habitualmente para fines citológicos, fisiológicos, estudios radiobiológicos y evaluación de toxicidad (Iqbal, 2016:pp. 785-802).

Como ventajas del ensayo de la técnica de micronúcleos tenemos la posibilidad de probar un sólo agente o sustancia química sin otro compuesto; o probar mezclas de muestras complejas, además

ofrece la posibilidad del análisis de una abundancia de células en diferentes periodos del ciclo celular y la formación de micronúcleos persistentes hasta la siguiente interface (MMAyA, 2014). Varios ensayos realizados sobre otras especies medicinales relacionan la presencia de ciertas sustancias químicas vegetales con el daño citotóxico y genotóxico. Algunos son capaces de causar mutaciones bacterianas y pueden retrasar potencialmente el desarrollo de cánceres en humanos. Varias plantas ya se han estudiado genotóxicamente, como el extracto de *Schinus terebinthifolius*, *Helichrysum simillimum*, *Helichrysum herbaceum* y *Helichrysum rugulosum*., que indica mutagenicidad. La detección y evaluación del daño causado por los componentes tóxicos de la planta es importante para reducir el riesgo cuando se usa terapéuticamente, particularmente durante el tratamiento prolongado (Macêdo et al., 2008:pp.509-516).

### ***1.12.2 Ensayos de irritabilidad ocular in vitro***

Los ensayos de irritabilidad ocular *in vitro* constituyen una alternativa fundamental para evaluar la seguridad de los productos cosméticos faciales, los cuales al entrar en contacto directo con las membranas mucosas oculares podrían generar irritación (Lagarto, et al, 2006: p.293).

Antiguamente estas pruebas se las realizaba en conejos mediante el test de Draize, sin embargo, por la agresividad y sufrimiento que causaban en los animales, la industria y varias agencias reguladoras han buscado alternativas, teniendo presente las tres R's de Rusell y Burch; que son la reducción, el refinamiento y reemplazo, lo cual ha motivado al fomento y desarrollo de métodos que contribuyan a disminuir la utilización de animales en pruebas toxicológicas (Murillo, 2003:p.187).

Las pruebas *in vitro* son una alternativa útil, no solo por la reducción de la exposición de los animales a productos potencialmente tóxicos, sino que además logran una buena correlación de los resultados obtenidos con las pruebas clínicas realizadas en animales (Lagarto, et al, 2006:p.293).

#### ***1.12.2.1 Test de membrana corioalantoidea en huevo de gallina HET-CAM***

El ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, conocido por las siglas HET-CAM de su nombre en inglés, es una prueba propuesta por Lüpke, modificada por Spielmann y por Steiling; que permite estimar *in vitro* el potencial de irritación ocular de sustancias y productos terminados (Murillo, 2003:p.187).

El método HET-CAM permite identificar reacciones por irritación similares a las que ocurren en el ojo de los conejos usando el Test de Draize, este método HET-CAM, determina tres reacciones hemorragia, lisis y coagulación de la membrana corioalantoidea al noveno día de su fecundación,

cuando el tejido nervioso y la percepción del dolor aún no se han desarrollado, pero hay evidencia de una notable vascularización (Murillo, 2003:p.187).

En el ensayo se examina y evalúa el daño vascular, se basa en registrar los tiempos necesarios para que se produzca la lesión, y el porcentaje de irritación se obtiene de acuerdo con la gravedad y la velocidad a la cual ocurre el daño, después de colocar la sustancia de ensayo de manera directa sobre la membrana corioalantoidea (Murillo, 2003:p.187).

La perspectiva más ampliamente utilizada para este ensayo, es la determinación del tiempo de reacción hasta la aparición de cada uno de los parámetros (hemorragia, lisis y coagulación), se ha evidenciado que una exposición de 5 minutos de la sustancia a ensayar es suficiente para visualizar los efectos tóxicos e irritantes (Bender et al., 2011:pp.530-537).

#### ***1.12.2.2 Test de membrana corioalantoidea en huevo de gallina con azul tripán CAM-TB***

Es un método complementario al HET-CAM, fue desarrollado por Hagino entre 1991 a 1993, este método proporciona una evaluación cuantitativa del daño generado en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (Murillo, 2003: p.187).

El colorante azul tripán retenido en la membrana se determina mediante métodos espectrofotométricos para cuantificar la proporción del daño en el tejido, es una medida más objetiva y cuantitativa de irritación que la obtenida por el método HET-CAM, en la cual solo se obtiene una estimación subjetiva de la hemorragia, lisis y coagulación (Espinoza, 2015:pp.25-28).

El ensayo CAM-TB se basa en que las células muertas, es decir aquellas que han sufrido deterioro en las paredes celulares se tiñen por el colorante azul tripán, debido a la unión con las proteínas dentro de las células, por lo tanto, la cantidad de colorante absorbido se correlaciona con la cantidad de células muertas de la membrana corioalantoidea (Wilson, et al.2015:pp.32-46)

## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1 Lugar de la investigación**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

#### **2.2 Recolección de la materia vegetal**

El material vegetal fue recolectado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, perteneciente a la parroquia Lizarzaburu, del cantón Riobamba, provincia de Chimborazo en el mes de septiembre del 2017 a una altura de 2842 m.s.n.m.

#### **2.3 Identificación botánica y taxonómica**

Se tomaron diferentes muestras de la planta, las cuales fueron identificadas en el herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, cuyo responsable es el Ing. Jorge Caranqui.

#### **2.4 Acondicionamiento del material vegetal**

Una vez recolectado el material vegetal, se procedió a la selección de aquellas hojas en buen estado, con una superficie integra y libre de coloraciones extrañas. A continuación, las hojas fueron lavadas con agua potable para retirar cualquier impureza y secadas durante 4 horas en una estufa de corriente de aire a una temperatura de 40 °C. Una vez seco el material vegetal, se procedió a pulverizar en un molino de cuchillas giratorias marca Arthur H, Tomas C.O, para finalmente obtener partículas pequeñas de 2 y 3 mm. El material fue almacenado en papel en un lugar fresco, seco y en la oscuridad para evitar cualquier tipo de contaminación.

## **2.5 Control de calidad de la droga cruda.**

### ***2.5.1 Determinación del contenido de humedad***

Se realizó mediante el método gravimétrico que se basa en la pérdida de masa por desecación en la estufa. Se partió de 2 gramos del material vegetal seco y triturado, los cuales se transfirieron a una capsula de porcelana previamente tarada y posteriormente colocada en la estufa a una temperatura de 105 °C durante 3 horas. Una vez cumplido el tiempo se colocó la capsula en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesó. Se transfirió nuevamente la capsula a la estufa durante una hora más y se repitió el proceso hasta alcanzar un peso constante (Miranda, 2000: pp. 34-35)

La determinación se realizó por triplicado y los cálculos se realizaron mediante la siguiente fórmula.

$$\%H = (M_2 - M_1) / (M_2 - M_1) * 100$$

Donde:

%H= porcentaje de pérdida de peso por desecación

M<sub>2</sub>= masa de la capsula con la muestra de ensayo (g)

M<sub>1</sub>= masa de la capsula con la muestra desecada (g)

M= masa de la capsula vacía

100= factor matemático

### ***2.5.2 Determinación de cenizas totales***

Se realizó por el método gravimétrico, obteniendo el residuo mediante incineración de la muestra. Para su determinación se pesaron 2 g ± 0.5 mg del material vegetal seco y triturado en un crisol previamente tarado. La muestra fue calcinada en un reverbero hasta quedar totalmente carbonizada, a continuación, fue incinerada en un horno mufla a una temperatura de 700 °C, durante 2 horas, cumplido el tiempo, el crisol fue colocado en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente para posteriormente ser pesado, el procedimiento se repitió cada 30 minutos hasta que el residuo fuera totalmente blanco y el peso constante (Miranda, 2000: p. 32).

En caso de presentar trazas de carbón en el residuo, se coloca gotas de peróxido de hidrógeno o ácido nítrico, y se evapora con la finalidad de que el residuo sea totalmente blanco. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados fueron obtenidos con la siguiente fórmula:

$$\%Cl = (M_2 - M) / (M_1 - M) * 100$$

%Cl= porcentaje de cenizas en base hidratada

M<sub>2</sub>= masa del crisol con la muestra incinerada (g)

M= masa del crisol vacío (g)

M<sub>1</sub>= masa del crisol antes del proceso de incineración (g)

100= factor matemático

$$\%Ct = Cl / (100 - H) * 100$$

%Ct= porcentaje de cenizas totales en base anhidra

Cl= porcentaje de cenizas en base hidratada

H= porcentaje de humedad

100= factor matemático

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

Es un método gravimétrico en el que, a partir de las cenizas totales obtenidas, se adiciona 20 ml de agua destilada, se procede a tapar el crisol con un vidrio reloj y se hace hervir de manera suave durante 5 minutos en un reverbero. Con ayuda de un papel filtro totalmente limpio se filtra la solución, el residuo retenido conjuntamente con el papel filtro se colocan nuevamente en el crisol, para posteriormente ser carbonizados en un reverbero e incinerados en un horno mufla a 700 °C, durante 2 horas (Miranda, 2000: p.33).

Cumplido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesó, el proceso se repitió en intervalos de media hora hasta alcanzar un peso contante. La determinación fue realizada por triplicado y los cálculos realizados mediante la siguiente fórmula.

$$\%Ca = (M_2 - M_a) / (M_1 - M) * 100$$

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

M<sub>2</sub>= masa del crisol con las cenizas totales (g)

$M_a$ = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

$M_1$ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

$M$ = masa del crisol vacío (g)

100= factor matemático

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

Se realizó mediante el método gravimétrico, en el que, a partir de las cenizas totales obtenidas, se añadió 3 mL de ácido clorhídrico HCl al 10 %. El crisol tapado con un vidrio reloj se calentó a baño maría durante 10 minutos, el vidrio reloj fue lavado con agua caliente y unido al contenido del crisol. Posteriormente la solución fue filtrada con ayuda de un papel filtro libre de cenizas y el residuo lavado con agua caliente, hasta que la solución filtrada al colocarse dos gotas de nitrato de plata 0,1 M no indique la presencia de cloruros. El filtrado con el residuo fue desecado en la estufa de 100- 105 °C para luego ser trasladados al crisol inicial e incinerados en un horno mufla a 700 °C, durante 2 horas. Cumplido el tiempo el crisol fue trasladado al desecador hasta llegar a temperatura ambiente y finalmente se pesó. El proceso se repitió a partir de la incineración de la muestra pesando el crisol cada media hora hasta obtener un peso constante (Miranda, 2000: p.33).

El ensayo se realizó por triplicado y para obtener el resultado se realizaron los cálculos mediante la siguiente fórmula.

$$\%B = (M_2 - M) / (M_1 - M) * 100$$

%B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

$M_2$ = masa del crisol con las cenizas insolubles en ácido clorhídrico base hidratada

$M$ = masa del crisol vacío (g)

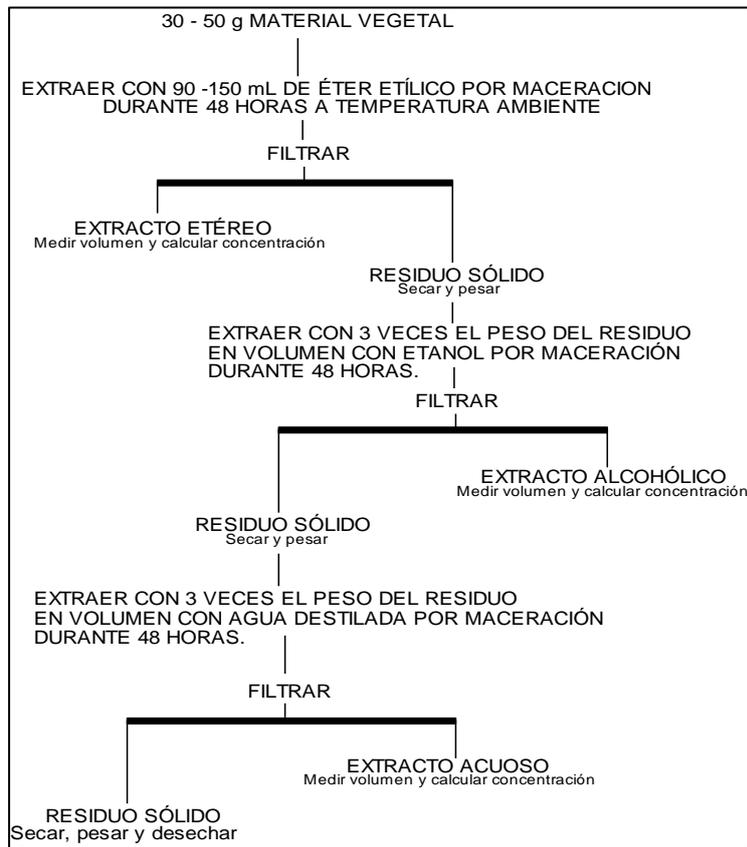
$M_1$ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

#### **2. 6. Tamizaje fitoquímico**

Por medio del tamizaje fitoquímico se procedió a identificar cualitativamente los compuestos químicos presentes en las hojas de *Buddleja incana*, para lo cual se pesó exactamente 30 g de la droga cruda, seca y triturada, y se realizó extracciones sucesivas con solventes de polaridad

creciente, con el fin de aumentar la extracción de sus metabolitos, los solventes utilizados fueron éter etílico, etanol y por ultimo agua. El procedimiento se indica a continuación.

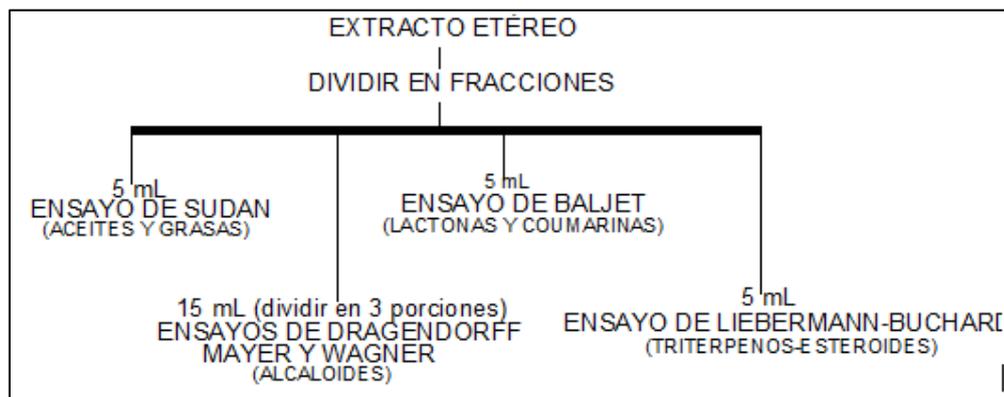
**Figura 1-2:** Proceso de extracción para realizar el tamizaje fitoquímico



Fuente: Miranda, 2000

Una vez obtenido cada uno de los extractos, se procedió a realizar los diferentes ensayos de caracterización correspondientes para cada extracto, e identificar los metabolitos secundarios mediante reacciones de precipitación o coloración.

**Figura 2-2:** Protocolo a seguir para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto etéreo



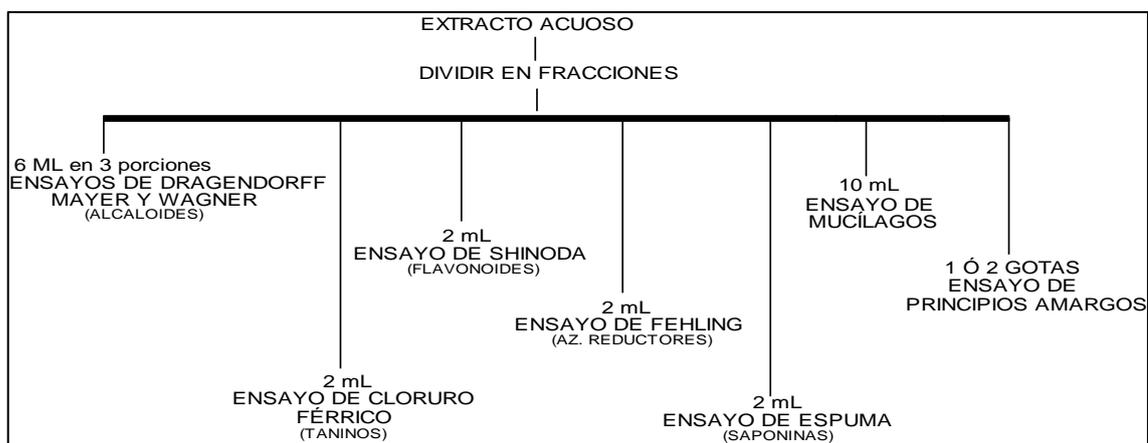
Fuente: Miranda, 2000

**Figura 3-2:** Protocolo a seguir para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico



Fuente: Miranda, 2000

**Figura 4-2:** Protocolo a seguir para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso



Fuente: Miranda, 2000

## 2. 7. Estandarización del extracto

### 2.7.1 Determinación de requisitos organolépticos: olor, color, sabor.

Para la determinación del olor se tomó una tira de papel filtro y se introdujo en el extracto alcohólico de *Buddleja incana* y se determinó si su olor era característico de la planta. El color se determinó llenando las tres cuartas partes de un tubo de ensayo completamente limpio y observando cuidadosamente su color, transparencia, presencia de partículas o la separación en capas (Miranda, 2000: p.56).

### **2.7.2 Determinación del pH.**

El pH del extracto alcohólico de *Buddleja incana* se midió con un medidor de pH digital marca Accumet XL 150 (Miranda, 2000: p.58).

### **2.7.3 Determinación de la densidad relativa.**

La densidad relativa comprende la relación entre la masa de un volumen de la sustancia analizar y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Para ello inicialmente se pesó el picnómetro vacío y seco, luego fue llenado con el extracto alcohólico de *Buddleja incana* se esperó 15 minutos a una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  y se procedió a pesar, la operación fue repetida con el agua destilada manteniendo la misma temperatura (Miranda, 2006: p.56).

La operación se llevó a cabo por triplicado y los resultados obtenidos mediante la siguiente fórmula.

$$D_{25} = (M_1 - M) / (M_2 - M)$$

Donde:

$D_{25}$  = densidad relativa del extracto alcohólico de *Buddleja incana*

$M_1$  = peso del picnómetro con el extracto alcohólico de *Buddleja incana* (g)

$M_2$  = peso del picnómetro con el agua (g)

$M$  = peso del picnómetro vacío (g)

### **2.7.4 Determinación del índice de refracción**

Para la determinación del índice de refracción se colocó una gota del extracto alcohólico de *Buddleja incana* sobre el prisma de medición, se cerró el termoprisma y se enfocó la luz por medio del espejo de tal modo que la intersección del retículo permanezca sobre la línea límite de los campos oscuro y claro (Miranda, 2000: p.56). El ensayo se realizó por triplicado.

### **2.7.5 Determinación de sólidos totales: método gravimétrico**

Los sólidos totales indican la variación de masa, por pérdida de sustancias volátiles, por acción del calor, para ello se tomaron 5 mL del extracto alcohólico de *Buddleja incana*, en una cápsula previamente tarada y se evaporó a baño de agua hasta que el residuo esté seco. Una vez seco el

residuo las capsulas fueron llevadas a la estufa durante 3 horas, para luego ser colocadas en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente, el proceso se repite hasta peso constante, en intervalos de una hora (Miranda, 2000: pp.58-59).

El ensayo fue realizado por triplicado y el porcentaje de sólidos totales calculados mediante la siguiente fórmula.

$$St = (Pr - P) / V * 100$$

St= porcentaje de sólidos totales

Pr= masa de la cápsula más el residuo (g)

P= masa de la cápsula vacía (g)

V= volumen de la porción de ensayo.

100=factor matemático para el cálculo.

## **2. 8. Obtención del extracto seco de *Buddleja incana***

Para la obtención del extracto seco de *Buddleja incana* se transfirieron 100 g del material seco y triturado a un frasco de vidrio color ámbar y se adicionó 1000 mL de etanol al 70 %, dejando macerar por un período de 72 horas, cumplido el tiempo se procedió a sonicar el extracto, por 45 minutos, se filtró y el residuo fue desecado. El filtrado obtenido fue trasferido a un balón de destilación y concentrado en un rotavapor marca BÜCHI 461 a una temperatura de 60°C hasta la evaporación completa del etanol, para posteriormente conservar el concentrado en refrigeración.

El concentrado obtenido fue colocado en nitrógeno líquido y una vez congelada la muestra se eliminó el agua por liofilización, al final del proceso se obtuvo el extracto seco de las hojas de *Buddleja incana* como un polvo fino, homogéneo de color marrón y de consistencia sólida.

## **2.9. Determinación de fenoles totales**

El contenido fenólico total del extracto de *Buddleja incana* se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, el cual es un ensayo que se basa en la transferencia de electrones y proporciona una capacidad de reducción que va expresada en el contenido fenólico. El contenido fenólico total de extractos de plantas y su rendimiento depende del solvente seleccionado para la extracción (Noreen et al., 2017: p. 794).

Para la determinación se preparó la curva de calibración, usando diferentes concentraciones de ácido gálico de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L de cada una de las concentraciones y se llevó a balones aforados de 25 mL, se adicionó 15 mL de agua destilada más 1.25 mL de reactivo de Folin, se homogenizó por 30 segundos en agitador Vortex y se dejó reposar durante 8 minutos, para luego colocar 3.75 mL de una solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 7.5 % y ser aforado a 25 mL, se homogenizó 5 veces y se dejó en reposo en la oscuridad durante dos horas, se efectuaron las lecturas en un espectrofotómetro a 765 nm (Huang y Ng, 2012: p.123).

Una vez obtenida la curva del ácido gálico, se preparó soluciones de 100 ppm en etanol al 70 % a partir del extracto seco de *Buddleja incana* y se procedió de la misma manera que el estándar. El contenido fenólico total se calculó como miligramo equivalente de ácido gálico (mg EGAE/g de liofilizado) por g de liofilizado mediante el uso de la curva de calibración del ácido gálico (Noreen et al., 2017: p. 794).

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se obtuvieron despejando la concentración en la ecuación de la recta, reemplazando el valor de la absorbancia y el resultando multiplicando por el factor de dilución.

## **2. 10. Determinación del contenido de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante colorimetría para ello se preparó un estándar de quercetina a diferentes concentraciones 20 ,40 ,60 80 y 100 ppm y se procedió de la siguiente manera.

Se tomó 1 mL de la solución de cada uno de los estándares, en tubos de ensayo, a cada uno de estos se adicionó 4 mL de agua destilada más 0.3 mL de solución de nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) al 5 %, se agitó cada una de las muestras y se dejó reposar durante 5 minutos protegido de la luz y a temperatura ambiente. Trascurrido los cinco minutos se adicionó 0.3 mL de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) al 10 % p/v se vorteziza por lo menos 1 minuto y se deja en reposo durante 5 minutos en oscuridad, luego se adicionó 2 mL de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 1 M, se vortezizó por 15 segundos y en este punto se aprecia la formación de un complejo rosado por la unión de los compuestos fenólicos con el aluminio, se guardan las muestras en oscuridad durante 15 minutos y finalmente se leen en es espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. (Huang y Ng, 2012: p.123)

Con las absorbancias obtenidas se obtuvo la curva de calibración  $A= 0.0014 C + 0.0144$  y se procedió de la misma manera, preparando soluciones de 100 ppm a partir del extracto seco de *Buddleja incana*, los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de quercetina

por mg de extracto seco (mg EQ/g de liofilizado). El ensayo se realizó por triplicado reemplazando el valor de la absorbancia y el resultando multiplicando por el factor de dilución (Huang y Ng, 2012: p.123).

## 2. 11. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del extracto de las hojas de *Buddleja incana* se midió usando el ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), radical libre que se monitorea por la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, dicha disminución del radical libre se da por acción de los antioxidantes presentes en el extracto y proporciona un índice de la capacidad antioxidante que se está evaluando (Mensor et al., 2001: pp. 128-129).

Para el ensayo se pesó 25 mg del liofilizado de las hojas de *Buddleja incana* y se aforó a 25 mL con etanol al 70 % obteniendo una concentración de 1000 ppm, se realizaron las diluciones respectivas para obtener concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm. Se preparó la solución de DPPH, pesando 5.9 mg del reactivo y aforando a 250 mL con metanol al 99 %, el reactivo fue guardado en obscuridad durante 40 minutos para que se estabilice (Costa et al., 2015: p. 415).

Posteriormente se realizó la curva de calibración del ácido gálico, para ello se pesó 25 mg de ácido gálico y se aforó a 25 mL, para luego realizar las diluciones a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm respectivamente.

De cada uno de los extractos de *Buddleja incana* a diferentes concentraciones, se tomó una alícuota de 100 µl, se adicionó 2.9 ml de la solución de DPPH, se vortearon los tubos y se incubaron durante 20 minutos a 37 ° C, de igual manera se procedió con cada una de las soluciones de ácido gálico a diferentes concentraciones.

Trascurrido el tiempo se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517nm, de la siguiente manera, metanol para encerrar el equipo, muestra de DPPH, blanco, patrón (estándares de ácido gálico) y las muestras de *Buddleja incana*. La inhibición de los radicales libres DPPH en porcentaje de inhibición (I%) se calcularon mediante la siguiente fórmula propuesta (Costa et al., 2015: p. 415)

$$I\% = \frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control} \times 100$$

Donde:

**% I** = corresponde al porcentaje de inhibición de los radicales libres

**Abs control**= Absorbancia de la muestra de la reacción control que contienen los reactivos excepto de prueba.

**Abs muestra**= Absorbancia del extracto de las hojas de *Buddleja incana*

Por último, se determinó Actividad antioxidante, mediante el cálculo de la cantidad de antioxidante necesario para inhibir el 50% del radical libre DPPH IC50 del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*.

## 2.12 Preparación del estándar McFarland

Para ejecutar ensayo de fotoprotección se preparó previamente el Estándar McFarland, esto es útil para ajustar la concentración de las suspensiones bacterianas que van a ser irradiadas, mediante una comparación de la turbidez (Ferraro et al, 2002: pp.310).

Para ello, se preparó el estándar McFarland 0.5 según lo que indica la FDA, que corresponde a una suspensión bacteriana con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ mL, se mezcló 0.5 mL de cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) al 1% p/v con 9.5 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 1% v/v y se obtuvo un precipitado de sulfato de bario como una solución blanquecina turbia (FDA 2001).

Para verificar la exactitud de la turbidez se realizó, un control del estándar McFarland mediante espectrofotometría, midiendo las absorbancias a una longitud de onda de 625 nm; para determinar el número de estándar McFarland correspondiente a cada una de las suspensiones, el valor obtenido de la absorbancia fue remplazado en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración realizada con estándar McFarland No 1, 2, 3, 4 (Ferraro et al, 2002:pp.310).

**Tabla 1-2:** Composición de la turbidez estándar de McFarland

Número de turbidez estándar	Cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) 1% mL	Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1% mL	Densidad de bacterias aproximada UFC
0,5	0.05	9.95	$1.5 \times 10^8$
1	0.10	9.90	$3.0 \times 10^8$
2	0.20	9.80	$6.0 \times 10^8$
3	0.30	9.70	$9.0 \times 10^8$
4	0.40	9.60	$1.2 \times 10^8$
5	0.50	9.50	$1.5 \times 10^8$
6	0.60	9.40	$1.8 \times 10^8$
7	0.70	9.30	$2.1 \times 10^8$
8	0.80	9.20	$2.4 \times 10^8$
9	0.90	9.10	$2.7 \times 10^8$
10	1,0	9.00	$3.0 \times 10^8$

Fuente: Ferraro & National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2002

### **2.13 Factor de protección solar mediante el método de muerte celular inducida a *Escherichia coli* ATCC 25922**

Realizando pequeñas modificaciones se aplicó el método de muerte celular inducida propuesto por José Guillermo Ávila Acevedo, para lo cual se reactivó una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, la cual fue cultivada en caldo de infusión cerebro corazón, para luego ser sembrada en agar Muller Hinton, las bacterias fueron incubadas hasta que alcanzaron su fase exponencial y estaban aptas para el ensayo (Avila Acevedo et al., 2005:p.303).

Se preparó una solución de 2000 ppm a partir del extracto seco de las hojas de *Buddleja incana*, pesando 50 mg del liofilizado en 25 mL de etanol al 70%, las soluciones de 20 y 200 ppm se prepararon mediante diluciones a partir de la solución madre de 2000 ppm, cada una de las soluciones fueron colocadas en tubos de cuarzo de 1 cm de diámetro, para la suspensión bacteriana de concentración 0.5 McFarland, se realizó suspendiendo una cantidad de bacterias en solución salina (cloruro de sodio) hasta alcanzar la turbidez requerida, 5 mL de la solución de bacterias fueron colocados de igual manera en cada uno de los tubos de cuarzo (Avila Acevedo et al., 2005:p.303).

Formando unidades experimentales se colocaron los tubos que contenían las suspensiones bacterianas detrás de cada uno de los tubos que contenían los extractos de *Buddleja incana* a diferentes concentraciones, las unidades experimentales fueron irradiadas con la ayuda de una lámpara UVB marca Philips Broadband TL 40 w/12 RS. a una dosis de radiación de 0.60 J/cm<sup>2</sup>, la radiación emitida fue controlada cada diez minutos con la ayuda de un radiómetro.

Para determinar la cantidad de UFC sobrevivientes a la radiación UVB, se sembraron aproximadamente 5 µL de la suspensión bacteriana de cada uno de los tubos en medio de cultivo agar Muller, la siembra se realizó cada 30 minutos durante 3 horas. Para los tiempos correspondientes a los 0 y 30 minutos se realizaron las diluciones respectivas con solución salina al 0.9 % (Avila Acevedo et al., 2005: p.303). En el ensayo se evaluó el extracto de las hojas de *Buddleja incana*, los controles octildimetil-PABA (pamidato O) y etilhexil metoxicinamato (OMC) a concentraciones de 20, 200 y 2000 ppm, cada muestra por triplicado, además se evaluó un blanco el cual contenía únicamente etanol al 70% (Avila Acevedo et al., 2005: p.303).

### **2.14 Determinación del Factor de Protección solar SPF *in vitro***

El factor de protección solar es una medida usada para evaluar la efectividad del protector solar; El SPF *in vitro* se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico de Mansur. Para lo cual, se preparó un extracto hidroalcohólico a partir del liofilizado de las hojas de *Buddleja incana* de

concentración 20 ppm, de igual manera los controles positivos (OMC y Pamidato) a la misma concentración, el blanco fue etanol al 70% utilizado como disolvente de las sustancias fotoprotectoras. (Oliveira et al., 2017)

Las muestras se analizaron por triplicado. Posteriormente, se realizó un barrido espectrofotométrico registrando las absorbancias a longitudes de onda ( $\lambda$ ) entre 290 y 320 nm, con intervalos de 5 nm. Las lecturas se hicieron en el espectrofotómetro UV Cole Parmer S2150 usando cubetas de cuarzo de 1 cm. El cálculo de SPF se obtuvo de acuerdo con la ecuación propuesta por Mansur (Oliveira et al., 2017).

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

Donde:

EE ( $\lambda$ ) representa el espectro de efecto eritemal

I ( $\lambda$ ) representa la intensidad del espectro solar

Abs ( $\lambda$ ) representa la absorbancia del producto con protección solar

CF es el factor de corrección igual a 10

Los valores de la relación entre el efecto eritemal y la intensidad de la radiación para cada longitud de onda EE ( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ ) son constantes como se indica a continuación. ( De Lima-Saraiva et al., 2017)

**Tabla2-2:** Valores de EE x I preestablecidos

**Table. 2:** Normalized product function used in the calculation of SPF

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

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

**Fuente:** (Mishra, & Chattopadhyay, 2012)

## 2.15 Determinación de la irritabilidad ocular *in vitro*, método HET-CAM

Para evaluar el potencial irritante del extracto de las hojas de *Buddleja incana*, se realizó mediante la prueba HET-CAM (prueba de la membrana corioalantoidea en huevo de gallina- de acuerdo con ICCVAM (Costa et al., 2015:pp.415-418)

La metodología seguida consistió en la aplicación de los extractos de *Buddleja incana* a diferentes concentraciones en embriones de pollos, para ello se preparó extractos de 62,5 125, 250 y 500 ppm. Para el ensayo se utilizó huevos frescos fértiles con un peso entre 50 -60 g, los cuales fueron colocados en una incubadora automática y mantenidos a una temperatura de  $37.5 \pm 0.5$  ° C con una humedad relativa de  $62.5 \pm 7.5\%$  durante 10 días (Bender et al., 2011:pp.530-537).

Una vez cumplido el tiempo, la cáscara de huevo alrededor de la cámara de aire fue retirada cuidadosamente y con la ayuda de unas pinzas la membrana blanca de la cascara fue removida de igual forma, exponiendo así la membrana coriolantoidea, para un análisis visual, en la cual se observa que la misma se encuentre en óptimas condiciones para la prueba (Reis Mansur et al. 2016b).

Después de que la CAM fue expuesta, se aplicaron 300 µl de cada uno los extractos en cada una de las membranas, para cada concentración se usaron tres huevos, luego de la aplicación de los extractos, se examinaron las membranas y los vasos sanguíneos durante 5 min. Se registró el tiempo de aparición, medido en segundos, de cada efecto irritante (hemorragia, lisis y coagulación). De igual manera se procedió con los controles positivo (NaOH 0.1 M) y un control negativo (agua destilad) (Costa et al., 2015:pp.415-418).

Mediante la siguiente fórmula se determinó la puntuación de irritación (IS):

$$IS = \frac{(301-H)*5}{300} + \frac{(301-L)*7}{300} + \frac{(301-C)*9}{300}$$

Donde H = es el tiempo necesario para comenzar las reacciones hemorrágicas

L = tiempo necesario para comenzar la lisis del vaso

C = tiempo necesario para comenzar la coagulación.

La puntuación promedio se calculó para cada extracto y los extractos se clasificaron en cuatro categorías: 0 - 0.99 correspondiente a no irritante; 1- 4.99 ligeramente irritante; 5.00-8.99 correspondiente a irritante moderado; y 9.00-21.00 correspondiente a irritante severo (Costa et al., 2015:pp.514).

## 2.16 Determinación de la irritabilidad ocular *in vitro*, método CAM-TB

Es un método cuantitativo para evaluar la toxicidad de varias formulaciones, la prueba utiliza azul Tripán como indicador de lesiones, además muestra una buena correlación con el test *in vivo* de Drize, test de irritación ocular realizada en conejos. La metodología seguida en este ensayo es similar a la ya descrita en el método HET-CAM hasta tener expuesta la CAM (Reis Mansur et al., 2016:p.253).

Posteriormente 300 µL de cada uno de los extractos preparados a diferentes concentraciones 62.5, 125, 250 y 500 ppm, fueron colocados en la superficie de la CAM, para luego de 20 segundos, ser removidos con solución salina, inmediatamente se colocaron 500 µl de una solución de tampón fosfato salino 0.1 % de la tinción de azul trypan por un minuto en un área limitada de la membrana, por un anillo de silicona de 18 mm de diámetro (Lagarto et al., 2006:pp. 251-258).

El exceso de la solución de azul Tripán se enjuaga con agua destilada y la zona de la membrana limitada por el anillo de silicona se retiró con ayuda de unas tijeras, la misma que fue colocada en 5 ml de una solución de formamida para luego ser agitados y centrifugados. La solución sobrenadante resultante, fue llevada al espectrofotómetro para medir su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La cuantificación de la tinción azul tripán que entró a las células podría estar correlacionada con el perjuicio causado por la formulación a la membrana coriolantoidea (Reis Mansur et al., 2016:p.253)

La puntuación para cada extracto fue evaluada utilizando la siguiente ecuación, se utilizaron tres huevos como control negativo los cuales fueron sometidos al mismo procedimiento, pero sin ser agregado ningún extracto (Costa et al., 2015:p.414).

$$\text{TBS} = d \times \frac{5}{1000} \times 10^9 \text{ nmol}$$

**TBS** = Cantidad de colorante absorbido

**d** = Concentración de colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón) /mg de membrana.

Cada extracto fue clasificado de acuerdo con un valor promedio de tres huevos basado en puntuaciones de acuerdo a la cantidad de colorante absorbido  $\leq 0.100$  nmoles/ mg no irritante, 0.100- 0.150 nmoles/ mg irritante moderado y  $\geq 0.150$  nmoles/ mg irritante severo (García, et al, 2004:p.104).

### **2.17 Determinación del potencial de Genotoxicidad (test de micronúcleos) MNs**

Para el ensayo de genotoxicidad se utilizó semillas de *Vicia faba* variedad Minor, las cuales fueron remojadas en agua destilada durante 24 horas y almacenadas a 4° C. cumplido el tiempo, las cascaras de las semillas fueron retiradas, y las plántulas comenzaron a germinar, para ello fueron colocadas entre dos capas de algodón humedecido (García-Bores et al., 2017:p.74).

Después de siete días, cuando las raíces primarias alcanzaron una longitud de 1-2 cm fueron seleccionadas al azar, 3 semillas por tratamiento, y fueron tratadas durante 24 y 48 horas con el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4% p / v, se utilizó agua de grifo como control negativo y etanol absoluto como control positivo, los tratamientos fueron incubados a 22 ° C (Iqbal, 2016:p.787).

Al finalizar el tiempo de exposición para cada tratamiento, las raíces fueron cortadas y colocadas en una solución de Farmer (25 mL de ácido acético y 75 mL de metanol) a 4° C durante 24 horas, cumplido el tiempo las semillas fueron hidrolizadas en HCl 1N a 55 ° C durante 8 minutos esto permitió romper los enlaces de la pared celular de la planta (García-Bores et al., 2017:p.74).

A continuación, las raíces fueron enjuagadas tres veces con agua destilada para eliminar el HCl y colocadas en etanol al 70% durante 10 minutos a 4° C y maceradas en ácido acético al 45%, se prepararon las regiones de células meristemáticas y F1 a partir de la punta de cada raíz por separado, cortando la sección meristemática alrededor de 1 mm de longitud por encima de la punta de la raíz y las células F1 (alrededor de 1 mm hacia arriba de la sección meristemática, los cortes fueron colocados en placas porta objetos (Corrêa et al., 2016:pp.200-201).

Por último, las secciones cortadas fueron teñidas durante 5 minutos con acetato de orceína al 1% para su posterior observación a través de un microscopio óptico. 3000 células se anotaron por cada grupo experimental y se determinó la frecuencia de micronúcleos MCN y el índice mitótico MI (García-Bores et al., 2017:p.74).

$$(MI) \text{ total} = \text{número de células de cada fase} \times 100/1000$$

$$(MCN) = \text{número de células interfásicas con MCN} \times 100/1000$$

### **2.18 Análisis de datos**

Los datos obtenidos en UFC sobrevivientes, del ensayo de fotoprotección mediante el método de muerte celular inducida a *Escherichia coli*, fueron transformados en áreas bajo la curva (ABC), tanto del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* como de los controles positivos Palmidato-O y OMC a concentraciones de 20, 200 y 2000 ppm, para su respectivo análisis estadístico.

El tratamiento de los datos obtenidos, se analizó mediante el programa estadístico SPSS STATICS 23, aplicando la prueba de Shapiro-Wilk se determinó si los datos provienen de una distribución normal, es decir medir el grado de concordancia entre los mismos, posteriormente se realizó el análisis de varianzas por medio del ANOVA de un factor y la prueba de Tukey para comparar las medias entre todos los tratamientos.

El ensayo de genotoxicidad también fue sometido a un análisis estadístico por medio del mismo programa estadístico antes indicado, en el cual se determinó la normalidad de los datos, tanto para el índice mitótico como de micronúcleos del extracto de *Buddleja incana* a diferentes concentraciones y de los controles positivo y negativo. Para el índice mitótico se aplicó ANOVA de un factor para establecer si existe diferencia significativa entre las muestras y el test de Tukey para comprar las medias de cada uno de los tratamientos.

En cuanto al índice de micronúcleos se determinó si los datos provienen de una distribución normal, para este caso los datos no son normales por lo que se procedió aplicar una prueba no paramétrica Chi-cuadrado para establecer si los tratamientos aplicados están relacionados o no.

## CAPÍTULO III

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

#### 3.1 Control de calidad de la droga cruda.

El control de calidad de la droga cruda constituye un parámetro esencial, el cual permite verificar que el material vegetal se encuentre en óptimas condiciones para el desarrollo de la investigación, los parámetros analizados comprenden el contenido de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico, los resultados obtenidos de cada uno de estos parámetros se especifican en la tabla 1-3.

**Tabla 1-3:** Resultados de los parámetros de control de calidad de *Buddleja incana*.

PARÁMETRO	<i>Buddleja incana</i> %	Referencia FEUM 2014	Referencia USP # 35
Contenido de Humedad	11.10 ± 0.16	<14 %	<14 %
Contenido de Cenizas Totales	5.22 ± 0.013	< 10%	≤ 12%
Contenido de Cenizas Solubles en Agua	4.85 ± 0.16	< 5%	≤ 7 %
Contenido de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico	0.25 ± 0.011	< 1.5 %	≤ 5%

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

El contenido de humedad de las hojas de *Buddleja incana*, se obtuvo mediante el método gravimétrico, que se basa en la pérdida de masa del material, por desecación en estufa; el valor obtenido fue de 11.10 %, este porcentaje se encuentra dentro de los parámetros establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y la USP # 35, en las cuales se especifica un contenido de humedad máximo de 14 %.

Al encontrarse el valor de humedad dentro del rango señalado, podemos asegurar que el material vegetal, conserva sus metabolitos y principios activos, ya que estos por acción del agua pueden sufrir procesos de oxidación e hidrolisis con la pérdida o degradación de los mismos, de igual

manera un contenido de humedad adecuado evitaría la proliferación de bacterias, insectos y hongos, garantizando la estabilidad y calidad de la droga vegetal durante la investigación (Miranda, 2000: pp. 34-35) (Mena et al. 2016)

Otro parámetro de calidad analizado es el contenido de cenizas totales, esta medida indica la cantidad de sales minerales presentes en la droga vegetal, el contenido de cenizas se determinó mediante el método gravimétrico por incineración de la muestra, y el porcentaje obtenido es de 5.22 %, este valor puede corresponder a fosfatos, carbonatos, sulfatos y silicatos propios de la especie. (Mena et al. 2016), ya que el valor encontrado está dentro de los rangos permitidos, en los cuales consideran un porcentaje máximo de 10 y 12 %, respectivamente.

El contenido bajo de cenizas totales para las hojas de *Buddleja incana*, afirma que dicha especie no presente contaminación con materia inorgánica o mineral, provenientes del suelo o durante su recolección o almacenamiento, de esta manera se evita cualquier tipo de interferencias generada por la contaminación con residuos inorgánicos o metales pesados, que puedan ejercer algún tipo de efecto no deseado (Miranda, 2000: p. 32).

Por último, para confirmar la calidad de la muestra vegetal, se determinó el contenido de cenizas solubles en agua, obteniendo un porcentaje de 4.85 y el contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico con un resultado de 0.25 %, ambos parámetros se encuentran dentro de los valores señalados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y la USP # 35, con lo cual podemos decir que la droga vegetal presenta óptimas condiciones para el desarrollo de la investigación.

Además, se ha comparado que los porcentajes obtenidos, para cada uno de los parámetros son muy similares con aquellos establecidos en estudios realizados previamente de esta especie, por lo que podemos confirmar la calidad y autenticidad de la planta en estudio (Llanga, 2014: pp. 39) (Lambre, 2015: pp.45-47).

### **3.2 Tamizaje fitoquímico**

Mediante el tamizaje fitoquímico se logró determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en *Buddleja incana*, el ensayo tiene como objetivo determinar mediante reacciones de precipitación y coloración, la presencia o ausencia de ciertos grupos funcionales que son representativos de los compuestos naturales (Mena et al. 2016). Para realizar el ensayo se partió del extracto seco de las hojas de *Buddleja incana* y mediante extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente; éter etílico, etanol y agua, se logró extraer la mayor cantidad de metabolitos según su polaridad y solubilidad (Miranda, 2001: pp.42-45).

**Tabla 2-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico de *Buddleja incana*

Ensayo	Metabolito	Extracto Etéreo	Extracto Alcohólico	Extracto Acuoso
<b>Sudán</b>	Aceites y grasas	+++	N/A	N/A
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	-	+ Opaco	-
<b>Mayer</b>	Alcaloides	-	+ Opaco	-
<b>Wagner</b>	Alcaloides	-	+ Opaco	-
<b>Balget</b>	Lactonas y cumarinas	-	++	N/A
<b>Lieberman-Burchard</b>	Triterpenos y esteroides	+++ verde oscuro	++	N/A
<b>Catequinas</b>	Catequinas	N/A	++ mancha UV	N/A
<b>Resinas</b>	Resinas	N/A	-	N/A
<b>Fehling</b>	Azúcares reductores	N/A	++	+
<b>Espuma</b>	Saponinas	N/A	-	-
<b>Cloruro Férrico</b>	Compuestos fenólicos	N/A	+++ verde intenso	+++ verde intenso
<b>Borntrager</b>	Quinonas	N/A	++ rojo capa superior	N/A
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	N/A	+++ amarillo intenso	++ amarillo intenso
<b>Antocianidinas</b>	Antocianidinas	N/A	-	N/A
<b>Mucílagos</b>	Mucílagos	N/A	N/A	-
+++ (Abundante), ++ (Moderado), + (Escaso), - (Ausencia), N/A (No Aplica)				

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

Los resultados se evidencian en la tabla 2-3, en la cual se destaca la presencia mayoritaria de triterpenos y esteroides, así como de compuestos grasos para el extracto etéreo.

En el extracto alcohólico hay una incidencia de flavonoides, por su coloración amarilla intensa; y de taninos al ver claramente un cambio de coloración de verde claro a verde oscuro en el ensayo

de Liebermann-Burchard, además se observó en menor cantidad la presencia de catequinas, azúcares reductores, lactonas, cumarinas y quinonas; y un escaso contenido de antocianidinas, saponinas y alcaloides.

En el extracto acuoso se confirmó la presencia de compuestos fenólicos en especial los flavonoides, metabolitos de interés en este estudio por sus propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas inmunomoduladoras y sobre todo fotoprotectoras frente a la radiación solar (García-Bores et al., 2017).

Finalmente, cabe resaltar que no se dispone de estudios recientes de *Buddleja incana*; sin embargo, la presencia diversos metabolitos ha sido reportada por otros autores en esta especie. En estudios realizados por Benavides, N. et al. (2011), se confirma que dicha especie contiene cantidades significativas de terpenos, flavonoides, y sus derivados, siendo además estos metabolitos a los cuales se les atribuye la actividad fotoprotectora en el estudio de la especie de *Buddleja scoronoides*. (Avila Acevedo et al., 2005).

### **3. 3. Estandarización del extracto de *Buddleja incana***

La estandarización del extracto se realizó con la finalidad de comprobar la calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*, mediante ensayos físico-químicos. Los parámetros evaluados fueron los determinados por Ochamendi y col, en lo que se incluyen características organolépticas, densidad relativa, índice de refracción, pH y sólidos totales (Mena et al. 2016). Los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros de calidad se presentan en la tabla 3-3 expresados como la media de tres repeticiones.

Los requisitos organolépticos son una de las medidas que se incluyen dentro de la estandarización del extracto, los resultados para el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*, indican que la muestra es de consistencia líquida, de color verde, con un olor herbal y de sabor amargo, estas particularidades son propias de las plantas y son atribuidas a los metabolitos presentes en el extracto, de esta especie.

En la determinación de la densidad relativa, se obtuvo un promedio de 0.89 g/ mL, este valor, es mayor en comparación con la densidad del alcohol etílico 96% (0.70 g/ mL), solvente empleado para la preparación del extracto, con esa densidad alcanzada podemos establecer, que la muestra contiene sustancias disueltas. La densidad encontrada, es muy similar a la establecida por Lambre V 0.8733 g/mL, en el extracto etanólico de la misma especie.

**Tabla 3-3:** Resultados de la estandarización del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*

Parámetros	Resultados
Requisitos organolépticos	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Olor</li> <li>• Sabor</li> <li>• Color</li> <li>• Aspecto</li> </ul>	Herbal Amargo Verde oscuro Liquido
<b>Densidad Relativa</b>	0.89 g/ mL
<b>Índice de refracción</b>	1.3635
<b>pH</b>	5.67
<b>Sólidos totales</b>	3.33 ± 0.03 %

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

Otro parámetro analizado comprende el índice de refracción, el cual mostró un resultado de 1.363 para el extracto de *Buddleja incana*, que en comparación con el índice de refracción del agua 1.33, revela la presencia de metabolitos y principios activos, los cuales fueron extraídos durante su elaboración.

El pH determinado para el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, fue de 5.67, valor que se encuentra dentro de la clasificación de ácido débil, cercano a la neutralidad pH=7, este valor de pH está determinado por la presencia de flavonoides, fenoles, taninos y otros, que aportan un carácter ácido al medio (Nobre, et al, 2008:pp.562-566).

El pH de esta especie es muy similar al establecido en fuentes bibliográficas con un valor de 5.7 (Lambre, 2015: pp. 48), encontrándose además dentro del rango de pH para la piel humana normal que varía de 4.5 a 6.0, con lo cual podemos decir que dicho extracto puede ser incluido fácilmente en formulaciones, siendo este valor de pH aceptable y no irritante para la piel (Smaoui, et al, 2017:pp.216).

El último parámetro analizado en este ensayo comprende el porcentaje de sólidos totales, el cual indica la presencia de sustancias disueltas en el medio, dando una estimación de la capacidad que tiene el solvente para extraer los metabolitos presentes en la droga cruda. (Mena et al. 2016). El porcentaje obtenido para el extracto de *Buddleja incana*, es de 3.33 %, valor que revela que el solvente empleado es el adecuado para extraer la mayor parte de los principios activos en esta especie y que, al cumplir con todos estos parámetros analizados previamente, se puede decir que

el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* contiene los compuestos de interés y es óptimo para el desarrollo de la investigación.

### **3.4. Obtención del extracto seco de *Buddleja incana***

El extracto seco de *Buddleja incana*, se obtuvo a partir de 100 g de las hojas trituradas, las cuales fueron maceradas en frío durante 72 horas con etanol al 70%, posteriormente se obtuvo el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, libre de clorofilas y desengrasado, el etanol fue eliminado en el rotavapor y se obtuvo el extracto acuoso, el cual fue congelado y liofilizando teniendo como resultado final un polvo fino, homogéneo de color marrón, libre de agua, lo que le proporciona una mayor estabilidad frente a agentes externos.

Para determinar el rendimiento de extracción se pesó el liofilizado obtenido de *Buddleja incana*, y se realizó los cálculos respectivos, alcanzando un porcentaje de extracción de 18.12%, el cual indica una buena eliminación de los solventes del extracto, y una concentración muy alta de principios activos, este proceso asegura que no exista pérdida de sustancias volátiles y que el material vegetal conserve un buen contenido de sustancias químicas, metabolitos secundarios, enzimas, vitaminas y otros compuestos propios de la especie (Miranda, 2001: pp.42-45).

### **3.5 Contenido de fenoles totales**

El contenido de fenoles se determinó por medio del método espectrofotométrico Folin –Ciocalteu, en el cual los compuestos fenólicos presentes en el extracto son oxidados por el reactivo Folin-Ciocalteu, produciendo una coloración azul, que es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos presentes (Rivas, et al, 2014).

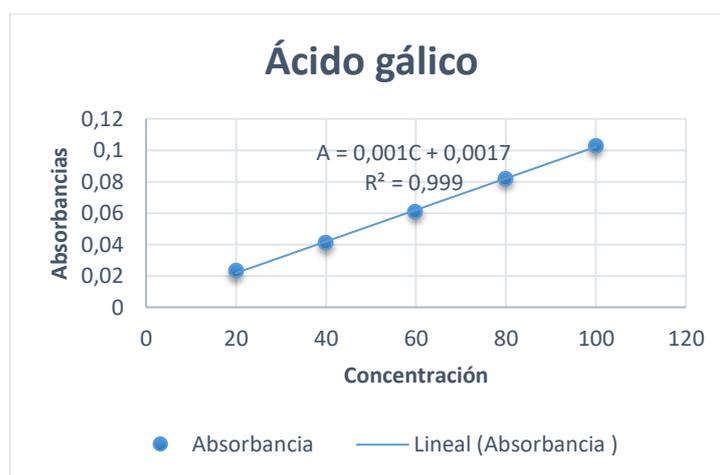
El contenido de fenoles totales en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*, se determinó, interpolando su absorbancia en la ecuación de la recta de referencia  $A=0.001 C + 0.0017$ , en la cual se obtuvo un coeficiente de determinación de  $R^2= 0.99$ , parámetro que indica un buen ajuste del modelo lineal. La curva de calibración corresponde al estándar de ácido gálico en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Tanto la muestra como los estándares fueron analizados por triplicado (Gráfico 6-3) (García et al , 2009:pp.388-395).

**Tabla 4-3:** Absorbancias del estándar de ácido gálico

Concentración de ácido gálico ppm	Absorbancia
20	0.023
40	0.041
60	0.061
80	0.082
100	0.103

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

**Figura 1-3:** Curva de calibración del ácido gálico



Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 5-3:** Contenido de fenoles totales en las hojas de *Buddleja incana*

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	FENOLES TOTALES	
<b>Extracto Hidroalcohólico de <i>Buddleja incana</i></b>	mg Eq GAE / g de extracto seco	Porcentaje %
	$279.6 \pm 0.57$	$27.9 \pm 0.57$

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

Los resultados obtenidos de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el liofilizado de las hojas de *Buddleja incana*, fue de  $279.6 \pm 0.57$  expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico, en un gramo de extracto seco, tabla 8-4 la presencia destacada de estos metabolitos en la planta sugiere que son los responsables de su actividad fotoprotectora.

La cantidad de compuestos fenólicos en este estudio es diferente a los reportados por Poma, E. et al. (2009) en un estudio con la misma especie, en que se establece un contenido de fenoles de 117.8 mg/g, esta diferencia es atribuida a la altura a la que fueron recolectadas las plantas, ya que según Caldwell, M. et al, a una mayor altura, la planta recibe mayor cantidad de radiación y por tanto hay un aumento en la producción de fenoles. (Benavides et al., 2011: p.93)

Los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en estudios de fotoprotección frente a la radiación UV, presentan propiedades tales como restauración de la síntesis de colágeno, hidratación de la piel, función de barrera entre otros. En el estudio de fotoprotección de *Buddleja scordioides* (Avila Acevedo et al., 2005) los dos metabolitos secundarios de tipo fenólico que presentan actividad fotoprotectora son verbascósido y linarina, al ser esta planta de la misma familia de *Buddleja incana*, podemos atribuir que los mismos compuestos son los responsables de la actividad fotoprotectora en este estudio.

### 3.6 Contenido de flavonoides.

El contenido de flavonoides se determinó mediante el método espectrofotométrico por quelación del cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>); (Mena et al. 2016) para lo cual se realizó una curva de calibración del estándar de quercetina, a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, obteniendo la ecuación de la recta  $A=0.0014C + 0.0144$ , con un coeficiente de determinación de  $R^2= 0.99$ . En este caso cabe indicar que se realizó la dilución del extracto de *Buddleja incana* 2:1, ya que la absorbancia obtenida estaba fuera del intervalo de la curva de calibración del estándar.

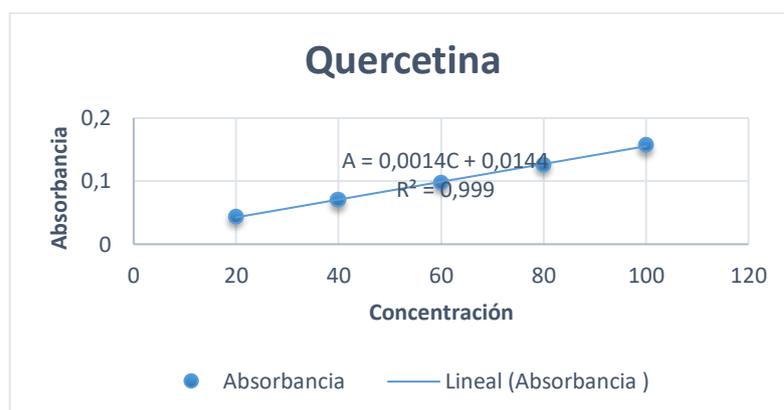
Los cálculos se realizaron reemplazando las absorbancias en la curva de calibración del ácido gálico, consiguiendo una concentración del extracto de 43.92 ppm, a partir de esta se calculó el contenido de flavonoides expresados en mg EQ de quercetina por g del extracto seco.

**Tabla 6-3:** Absorbancias del estándar de quercetina

Concentración de quercetina ppm	Absorbancia
20	0.044
40	0.07
60	0.098
80	0.126
100	0.157

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

**Figura 2-3:** Curva de calibración de quercetina.



Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 7-3:** Contenido de flavonoides en las hojas de *Buddleja incana*

SUSTANCIAS FOTOPROTECTORA	FLAVONOIDES	
	mg equivalentes de quercetina / g de extracto seco	Porcentaje %
<b>Extracto Hidroalcohólico de <i>Buddleja incana</i></b>		
	6.578 ± 0.020	0.065 ± 0.020

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

En la tabla 8-4 se expresa el contenido de flavonoides encontrados en el liofilizado de las hojas de *Buddleja incana* en miligramos equivalentes de quercetina por gramos de muestra seca, este valor alcanzado es de  $6.578 \pm 0.020$  y constituye la media de tres repeticiones ensayadas. Los resultados indican que la droga vegetal contiene flavonoides, los cuales son biosintetizados como mecanismos de defensa frente a la radiación ultravioleta que recibe la planta (Korać y Khambholja, 2011).

En la investigación realizada por Lambre, 2015, se establece que los principales flavonoides identificados mediante una cromatografía en capa fina del extracto de *Buddleja incana*, comprenden a los Rf de quercetina 0.47, kaempferol 0.78 y verbascósido 0.36 los cuales fueron comparados con fuentes bibliográficas y a los que se les atribuye la actividad fotoprotectora en varios estudios con esta familia. (Avila Acevedo et al., 2005) (Lambre, 2015: p. 51).

Esta cantidad de flavonoides encontrada en *Buddleja incana*, es muy similar a los reportados en estudios realizados con el extracto metanólico de esta especie, en la cual se establece un contenido de 7.73 mg equivalentes de quercetina / g de extracto seco (Benavides, N. et al. 2011: pp.93). No

se disponen de estudios bibliográficos de fotoprotección sobre esta especie sin embargo en comparación con otras plantas ensayadas este valor obtenido del contenido de flavonoides resulta ser relativamente bajo, pero no significativo ya que existen especies con un contenido más bajo de flavonoides 2.64 mgEQ/g pero con una actividad fotoprotectora pronuncia como en el caso de las cáscara de *Spondias purpurea L* por citar uno de muchos ejemplos (Silva et al. 2016).

Por último, podemos establecer que la cantidad de flavonoides encontrados en *Buddleja incana*, se corrobora con los resultados obtenidos en el ensayo de actividad fotoprotectora *in vitro*, en el que vimos que la planta no presenta una actividad fotoprotectora mayor que los controles, sin embargo, si protege durante un cierto tiempo de los rayos UV, ya que contiene compuestos naturales que actúan como filtros solares capaces de bloquear o neutralizar la radiación.

### 3.7 Capacidad captadora de radicales libres

La determinación de la capacidad antioxidante de las hojas de *Buddleja incana*, se lo realizo mediante el método espectrofotométrico con el radical libre DPPH; que se basa en la reducción del radical DPPH por la aceptación de un átomo de hidrogeno, con el consiguiente cambio de coloración de purpura a amarillo; el resultado se expresó como IC50 que corresponde al valor de concentración del extracto necesario como inhibir el 50% de los radicales DPPH\*. El resultado presentado corresponde a la media de tres repeticiones ensayadas y se obtuvo mediante una regresión polinómica utilizando el programa BLeSq (tabla 12-3).

**Tabla 8-3:** Actividad antioxidante de las hojas de *Buddleja incana*

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	Actividad antioxidante IC50 (µg/ mL) ± SD	Actividad antioxidante según los valores de IC50
Extracto hidroalcohólico de <i>Buddleja incana</i>	203.24 ± 13.17	Óptimo (IC50 < 15 µg/mL) Bueno (15 µg /mL < IC50 < 50 µg/mL) Promedio (50 µg/ mL < IC50 < 100 µg/mL) Débil (IC50 ≥ 100 µg/mL)

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

Los resultados de la tabla anterior muestran el IC50 calculado de hojas de *Buddleja incana* expresados en ug/mL; este valor encontrado es de 203.24 ± 13.17, lo que indica que dicha especie presenta una actividad antioxidante débil, ya que según Seheh (2013), mientras menor sea el IC50 en una muestra, mayor será su capacidad antioxidante.

El valor calculado de la actividad antioxidante no es similar al encontrado en bibliografía ya que se establece un IC50 del extracto crudo de *Buddleja incana* de 10 µg/mL, de igual manera en el estudio de la actividad antioxidante por el método de quimioluminiscencia, en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana* se establece una actividad antioxidante óptima de  $180629,191 \pm 293,399$  µg ácido gálico/g extracto, atribuyendo la mejor actividad antioxidante para esta especie (Rosas, 2014:p.249) (Moya, 2017:p. 34).

Este valor establecido de la capacidad antioxidante de *Buddleja incana*, no concuerda con la cantidad de flavonoides y fenoles encontrados, ya que esta especie al contener gran cantidad de compuestos polifenólicos se esperaría conseguir una actividad antioxidante óptima, sin embargo, al encontrar resultados buenos de la actividad antioxidante en bibliografía podemos establecer que este método de evaluación de la capacidad antioxidante aplicado no es el más adecuado.

De igual forma hay que tener en cuenta que el potencial antioxidante está dado por la presencia de sustituyentes donadores de electrones en la estructura del anillo de tipo fenólico, así como de la cantidad y disposición de grupos hidroxilo y que muchos antioxidantes tienen la capacidad de reaccionar o no con los radicales, como por ejemplo los de tipo peroxilo, que no lo hacen con el radical DPPH, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo que hace que las sustancias de estructuras grandes generalmente muestren una menor actividad, razón por la cual puede verse afectada la determinación de la actividad antioxidante por este método (Tamboli y More, 2016:p.226).

### **3.8 Control de calidad del Estándar McFarland**

Para el control de calidad del Estándares McFarland, la absorbancia de la muestra obtenida a una longitud de onda de 625 nm fue de 0.1, este valor se encuentra dentro de las especificaciones para el estándar McFarland N ° 0.5, que según Koneman et al., (2006, p. 932) va de 0.08 a 0.1. Para tener un mejor control de la muestra, se reemplazó la absorbancia en la ecuación de la recta  $y = 0.1921 X + 0.0037$ ; logrando un resultado de 0.5 McFarland, lo cual indica que la muestra si corresponde al número del estándar McFarland buscando.

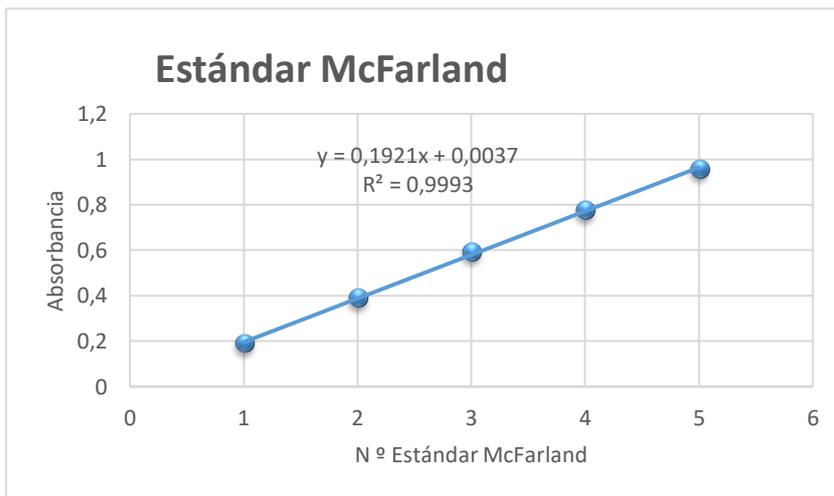
Así mediante este control de calidad se comprobó que la turbidez alcanzada en el estándar McFarland N ° 0.5, proporciona una densidad ópticamente comparable para conseguir una suspensión de bacterias de  $5 \times 10^8$  UFC/ mL aproximadamente; alcanzando la estandarización de las suspensiones bacterianas, que van a ser utilizadas en el ensayo de la actividad fotoprotectora, con el propósito de conseguir resultados confiables (Avila Acevedo et al., 2005).

**Tabla 9-3:** Absorbancia de los Estándares McFarland

N ° Estándar McFarland (X)	Absorbancia 625 nm. (Y)
1	0.189
2	0.388
3	0.592
4	0.775
5	0.956
X	<b>0.10</b>

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

**Figura 3-3:** Curva de calibración del estándar McFarland



Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

### 3.9 Factor de protección solar mediante el método de muerte celular inducida a *Escherichia coli* ATCC 25922

**Tabla 10-3:** Efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*

TIEMPO (minutos)	BLANCO UFC/ mL	20 ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	2000 ppm UFC/mL
0	50777777.67 (±10884920)	41333333.33 (±3511884.584)	36000000 (±5291502.62)	42000000 (±6244997.99)
30	0	3000000 (±1000000)	6000000 (±1000000)	11333333.33 (±1527525.23)

60	0	0	4666.66 (±1154.70)	9333.33 (± 3055.05)
90	0	0	0	2000 (±0)
120	0	0	0	0
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 11-3:** Efecto fotoprotector del control positivo Palmidato-O

<b>TIEMPO (minutos)</b>	<b>BLANCO UFC/ mL</b>	<b>20 ppm UFC/mL</b>	<b>200 ppm UFC/mL</b>	<b>2000 ppm UFC/mL</b>
0	50777777.67 (±10884920)	50666666.7 (±7505553.5)	55000000 (± 3464101.62)	52333333.3 (±10214369 )
30	0	3333333.33 (± 577350.2)	8666666.67 (±1527525.23)	16000000 (± 1000000)
60	0	2666.66 (±1154.70 )	10000 (± 2000)	18000 (±2000)
90	0	0	6666.6 (±3055 )	11333.3 (± 3055)
120	0	0	0	4666.6 (±1154.7)
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

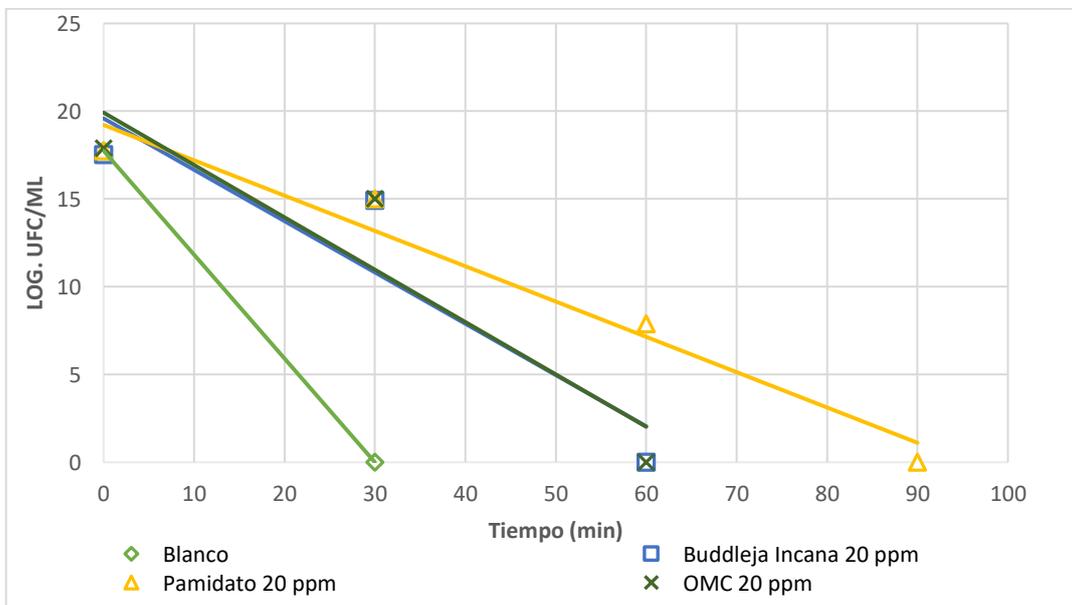
Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 12-3:** Efecto fotoprotector del control positivo OMC

TIEMPO (minutos)	BLANCO UFC/ mL	20 ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	2000 ppm UFC/mL
0	50777777.67 (±10884920)	59000000 (±6082762.53)	52666666.7 (±6806859.29)	56666666.7 (±4163332)
30	0	3333333.33 (±577350.26)	6666666.67 (±1527525.23)	18333333.3 (±2516611.48)
60	0	0	5333.33 (±1154.7)	22000 (±2000)
90	0	0	0	17333.3 (±3055.05)
120	0	0	0	8000 (±2000)
150	0	0	0	0
180	0 </td <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td>	0	0	0

Realizado por: Samaniego, Valeria 2018

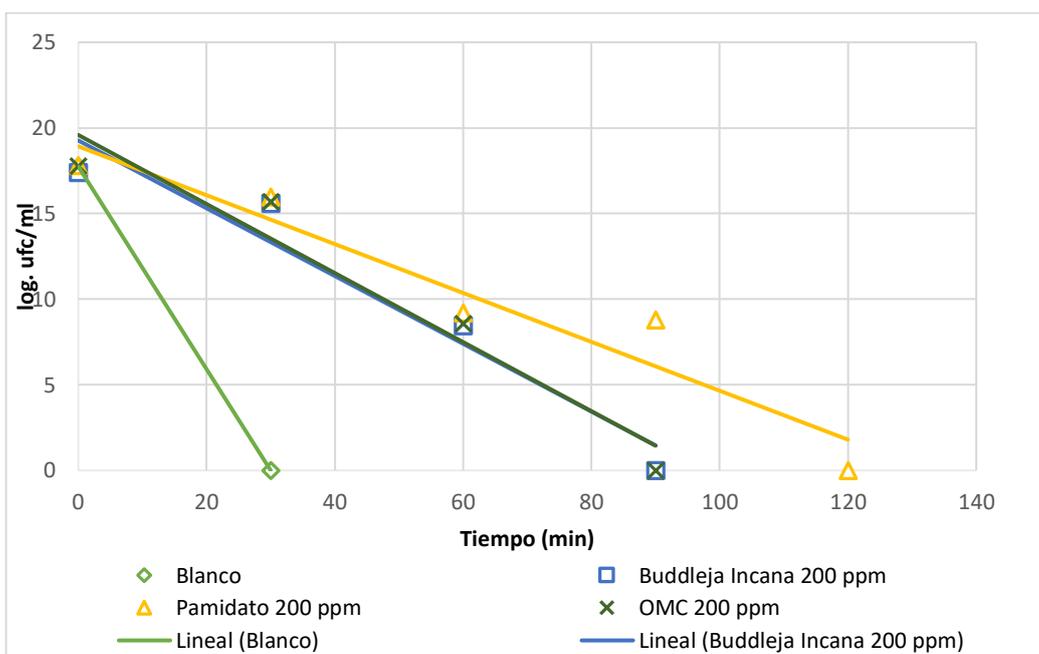
**Figura 4-3:** Efecto fotoprotector, contra la muerte celular inducida a *E. coli* por la radiación UVB. Blanco, *Buddleja incana* 20 ppm, Pamidato 20 ppm, OMC 20 ppm.



Realizado por: Samaniego Valeria. 2018

Blanco	<i>Buddleja incana</i> 20 ppm	Pamidato 20 ppm	OMC 20 ppm
$y = -0.5914 X + 17.743$ $R^2 = 1$	$y = -0.2923X + 19.586$ $R^2 = 0.8593$	$y = -0.2012 X + 19.215$ $R^2 = 0.9612$	$y = -0.2982X + 19.917$ $R^2 = 0.8669$

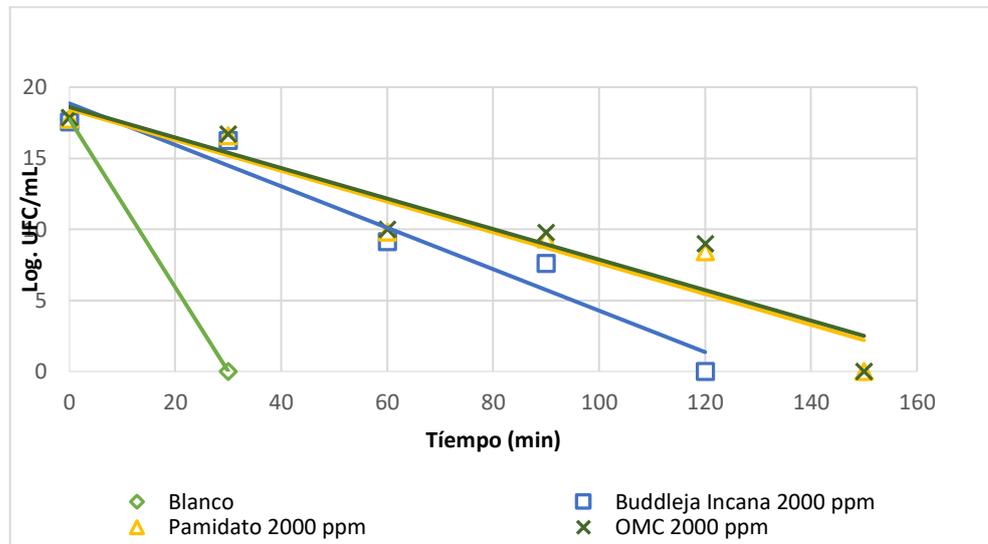
**Figura 5-3:** Efecto fotoprotector, contra la muerte celular inducida a *E. coli* por la radiación UVB. Blanco, *Buddleja incana* 200 ppm, Pamidato 200 ppm, OMC 200 ppm.



Realizado por: Samaniego Valeria. 2018

Blanco	<i>Buddleja incana</i> 200 ppm	Pamidato 200 ppm	OMC 200 ppm
$y = -0.5914 X + 17.743$ $R^2 = 1$	$y = -0.1979X + 19.267$ $R^2 = 0.9367$	$y = -0.1427 X + 18.926$ $R^2 = 0.9245$	$y = -0.2016X + 19.589$ $R^2 = 0.942$

**Figura 6-3:** Efecto fotoprotector, contra la muerte celular inducida a *E. coli* por la radiación UVB. Blanco, *Buddleja incana* 2000 ppm, Pamidato 2000 ppm, OMC 2000 ppm



Realizado por: Samaniego Valeria. 2018

Blanco	<i>Buddleja incana</i> 2000ppm	Pamidato 2000 ppm	OMC 2000 ppm
$y = -0.5914 X + 17.743$ $R^2 = 1$	$y = -0.1458X + 18.857$ $R^2 = 0.9453$	$y = -0.1083 X + 18.449$ $R^2 = 0.8969$	$y = -0.1073X + 18.605$ $R^2 = 0.8805$

El efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida, por la radiación UVB, se evaluó usando *E.coli* como modelo celular. Los datos obtenidos en UFC sobrevivientes tanto de los controles como del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, fueron transformados, y mediante fórmulas matemáticas se obtuvieron los resultados expresados como, tasa de mortalidad (k), dicha tasa tiene una relación inversamente proporcional con la capacidad fotoprotectora de las sustancias en análisis, de tal manera que un porcentaje bajo en muerte de *E.coli*, supone una mayor actividad fotoprotectora para bloquear la radiación UVB(García-Bores et al., 2017:pp.77).

De acuerdo a los resultados, la población bacteriana promedio sin protección alcanzó la muerte celular antes de los 30 minutos, con una disminución de las UFC sobrevivientes igual a cero, a los 30 minutos del ensayo se evidencio una reducción de las UFC tanto para los controles positivos etilhexil metoxicinamato (OMC) y octildimetil-PABA (Pamidato O) como para el

extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, los cuales al comparar con el control negativo, aquel sin protección (etanol 70 %), su actividad fotoprotectora fue muy pronunciada.

Contrastando el efecto fotoprotector de *Buddleja incana*, con los controles positivos, filtros químicos convencionales incorporados en varias formulaciones de fotoprotección, podemos ver que tanto el extracto de *Buddleja incana* a 20 ppm, como el OMC a la misma concentración, presentan una actividad fotoprotectora muy similar, con una tasa de mortalidad de  $K= 0.29$  y un tiempo de inactivación de la población hasta los 60 minutos. Por el contrario, el otro estándar Pamidato O a 20 ppm mostro un mayor efecto fotoprotector ya que llego hasta los 90 minutos, pero no difiere significativamente de los otros compuestos analizados, ya que su tasa de mortalidad es casi igual.  $K= 0.20$ . (gráfico 2-3)

Por medio de un análisis del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, y los estándares a mayor concentración 200 ppm, se observó un comportamiento muy similar al encontrado a los 20 ppm, donde el extracto y el OMC presentan una actividad fotoprotectora equivalente, en este caso alcanzan un tiempo de supervivencia de las colonias de 90 minutos, y una tasa de mortalidad de  $K= 0.19$  y  $K= 0.20$ , respectivamente, siendo de igual forma el pamidato O quien presenta mayor efecto fotoprotector. (gráfico 3-3). A una concentración más alta 2000 ppm podemos ver que el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, no presenta una actividad fotoprotectora igual a los estándares, sin embargo, su tasa de mortalidad  $K= 0.20$  sigue siendo baja lo cual muestra que es capaz de proteger a las colonias de su inactivación por la radiación UV. (gráfico 4-3).

En este ensayo se pudo confirmar que el porcentaje de supervivencia de las bacterias depende directamente de las concentraciones a las cuales fueron analizadas las sustancias fotoprotectoras, siendo así, que las sustancias de mayor concentración, proporcionan mayor efecto fotoprotector y por más tiempo que aquellas de menor concentración.

En el estudio realizado por Ávila Acevedo y colaboradores en el año 2005, de la actividad fotoprotectora, se manifiesta que el extracto metanólico de *B. scordioides* posee una actividad fotoprotectora pronunciada, alcanzando la muerte celular de la población bacteriana a los 37 a 65 minutos, resultando ser más activo que el control positivo escalol. Su efecto fotoprotector lo atribuyen a verbascósido y linarin metabolitos presentes en la planta. (Avila Acevedo et al., 2005:pp. 301-309)

García Bores y colaboradores en el estudio de la determinación de la actividad fotoprotectora de los polifenoles de *Yucca periculosa*, en el año 2010, menciona que la exposición a los rayos UVB producen una disminución rápida de la población bacteriana debido al daño producido en el ADN. (García Bores, et al., 2010, pp. 100-108)

En la investigación del efecto fotoemopreventivo contra la carcinogénesis cutánea inducida por la radiación UVB en *Lippia graveolens*, del año 2017, muestra que el extracto metanólico de *Lippia graveolens* no alcanza la muerte celular hasta los 150 minutos de irradiación con una tasa de mortalidad de  $K = 0.048$ , siendo similar al compuesto activo en filtro solares, Parsol. La actividad fotoprotectora se le atribuyen a inocembrina, naringenina y galangina encontrados en el extracto (García-Bores et al, 2017:pp. 72-81).

Relacionando los estudios de fotoprotección de otras especies con *Buddleja incana*, podemos decir que los metabolitos presentes en las hojas de esta especie, principalmente los flavonoides y fenoles identificados como quercetina, kaempferol y verbascósido, poseen una actividad fotoprotectora *in vitro*, ya que son capaces de proteger contra la muerte celular hasta los 90 minutos de irradiación, lo que en comparación con *B. scordioides* planta de la misma familia solo protege contra la muerte celular hasta 37 a 65 minutos (Avila Acevedo et al., 2005:pp. 301-309).

### 3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos del ABC del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* y de los controles OMC y Pamidato O a diferentes concentraciones. Primero se determinó la normalidad de los datos, para ello se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, con esta prueba se identificó que los datos provienen de una distribución normal, posteriormente se aplicó el test de ANOVA de un factor, para determinar si existe diferencia significativa entre los fotoprotectores.

Planteamiento de hipótesis:

**H<sub>0</sub>:** No existe diferencia significativa en los fotoprotectores (OMC, Pamidato O y *Buddleja incana*) en índice de fotoprotección  $p \geq 0.05$

**H<sub>1</sub>:** Existe diferencia significativa en los fotoprotectores (OMC, Pamidato O y *Buddleja incana*) en índice de fotoprotección  $p \leq 0.05$

Decisión: Existe argumentos para desechar  $H_0$ , ya que el nivel de significación es menor a 0.05 (0.00) por lo tanto existe diferencia significativa en los fotoprotectores (OMC, Pamidato O y *Buddleja incana*) con respecto al índice de fotoprotección

**Tabla 13-3:** Test ANOVA de un factor para el índice de fotoprotección

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,419E+18	9	1,577E+17	10,649	,000
Dentro de grupos	2,961E+17	20	1,480E+16		
Total	1,715E+18	29			

**Realizado por:** Samaniego Valeria. 2018

Mediante el test de Tuckey se realizó varias comparaciones múltiples entre dos grupos, en las cuales se puede establecer que no existe diferencia significativa entre que el extracto de *Buddleja incana* a 20 ppm, 200ppm y 2000 ppm, con los controles OMC y Pamidato O a las mismas concentraciones, estableciéndose un valor de significancia mayor a 0.05 en cada uno de los casos respectivamente, por lo que podemos establecer que las hojas de *Buddleja incana* si presentan un potencial efecto fotoprotector igual a los filtros químicos incluidos en fotoprotectores convencionales. (anexos)

### 3.11 Factor de Protección solar SPF *in vitro*

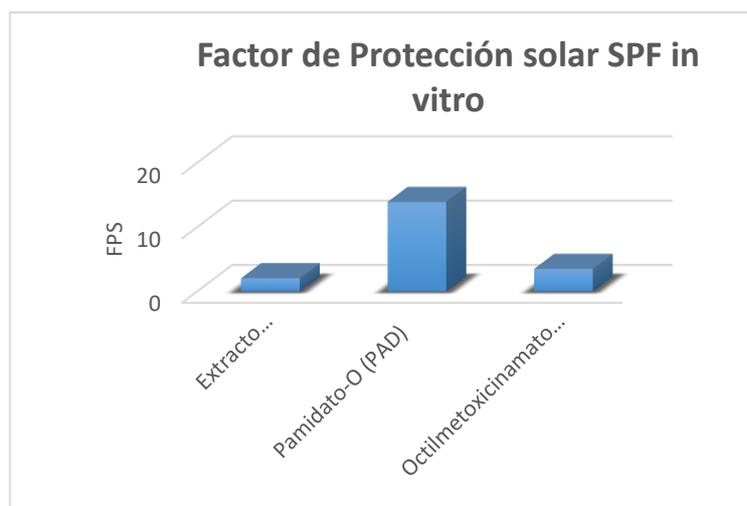
Se determinó el factor de protección solar (FPS) mediante el método *in vitro* descrito por Mansur, tanto para el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*, como para los controles OMC y Pamidato O, a concentraciones de 10 ppm. Las absorbancias medidas a longitudes de onda de 290 a 320 nm, fueron remplazadas en la ecuación de Mansur, para luego obtener el FPS total frente a la radiación UVB. Tabla 6-4.

**Tabla 14-3:** Resultados del Factor de Protección solar *in vitro*

<b>SUSTANCIA FOTOPROTECTORA (10 ppm)</b>	<b>FPS <i>in vitro</i></b>
Extracto hidroalcohólico de <i>Buddleja incana</i>	2.05 (±0.21)
Pamidato-O (PAD)	17.81 (±0.15)
Octilmetoxicinamato (OMC)	12.50 (± 0.11)

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

**Figura 7-3:** Factor de Protección solar *in vitro* de *Buddleja incana*



**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

Los resultados del FPS para cada una de las sustancias expuestas, muestran que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana*, tiene un índice de fotoprotección muy bajo 2.05 en comparación con los controles (gráfico 5-3). Esto puede atribuirse a que la concentración a la que fueron ensayadas 10 ppm, no fueron las adecuadas para obtener un FPS significativo, ya que como indicamos en el ensayo anterior por el método de muerte celular inducida, a una concentración de 20 ppm el extracto presentó una actividad fotoprotectora baja.

En estudios previos con extractos de plantas de diferentes especies, se establece que el espectrofotómetro tiende a saturarse al experimentar con concentraciones muy altas, dando resultados de absorbancias constantes (erróneos) para todas las longitudes de onda, por lo tanto, el ensayo fue realizado a una concentración de 10 ppm (Cajamarca, 2016: pp. 54). Sin embargo, en este caso se puede evidenciar que a esta concentración los resultados no son los adecuados y no se asemejan a los encontrados en fuentes bibliográficas (FPS 12.98 Pamidato-O y 5.48 OMC), por lo que podemos comprobar que el análisis a una concentración de 10 ppm, por este método no es el más apropiado (El-Boury, et al, 2007:p.3).

Adicionalmente, se puede establecer que un valor de FPS bajo encontrado por el método de Mansur, puede ser generado porque este restringe la eficacia de las formulaciones o extractos que contengan compuestos con actividad fotoprotectora, ya que la prueba es realizada únicamente en el rango UV de 290 a 320 nm, y no incluye todo el rango UV; es decir desde los 200 a 400 nm, factor que puede incidir significativamente en el resultado obtenido para *Buddleja incana*. Por esta razón es que varios autores establecen que este método no es el más adecuado para establecer un FPS real para un compuesto o formulación (Inocente, 2014:p.76) (Smaoui et al., 2017;p.1218).

### 3.12 Irritabilidad ocular *in vitro*, método HET-CAM

Para la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, mediante el método de membrana corioalantoidea en huevo de gallina, se obtuvo en segundos los parámetros de hemorragia, lisis y coagulación, estos fueron analizados, y mediante cálculos realizados se obtuvo el índice de irritación, este permitió clasificar a las sustancias de acuerdo a su potencia de irritación como se presenta en la tabla a continuación. (Ávila et al., 2017:pp.83-93)

**Tabla 15-3:** Resultados de la determinación de irritabilidad ocular, HET-CAM

Muestras	ÍNDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
Extracto de <i>Buddleja incana</i>		
62.5ppm	0	NO IRRITANTE
125 ppm	0	NO IRRITANTE
250 ppm	0	NO IRRITANTE
500 ppm	0.083 ± 0.88	NO IRRITANTE
Na OH 0,1 M *	19.15 ± 0.28	IRRITANTE SEVERO
Agua destilada**	0	NO IRRITANTE

\*control positivo \*\* control negativo

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

Los resultados demostraron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana* a 62.5, 125 y 250 no presentan un índice de irritación y por tanto son clasificadas como no irritantes; mientras que para una concentración de 500 ppm presentó un potencial de irritación muy bajo 0.083 y no significativo; por lo que la sustancias es clasificada de igual forma como no irritante.

Para tener un mejor control del ensayo se evaluaron controles positivos y negativos, establecidos en bibliografía, para los cuales se evidenció que la exposición de la membrana corioalantoidea al hidróxido de sodio NaOH (0.1N) desencadena un daño vascular severo con un puntaje de irritación de 19,15 ± 0,28; alcanzando una clasificación final de severamente irritante, este valor calculado es muy similar al establecido en fuentes bibliográficas. (Costa et al., 2015 p. 417)

Por el contrario, para el control negativo (agua destilada) no se produjo ningún daño vascular sobre la membrana corioalantoidea, de igual forma que para los extractos de *Buddleja incana*, en los cuales no se observó la presencia de hemorragia, lisis de vasos ni coagulación, durante los 5 minutos de análisis. (de Ávila et al., 2017:pp.83-93)

Por lo tanto, al obtener una clasificación final como no irritante para los extractos de *Buddleja incana* a diferentes concentraciones, podemos establecer que dicho extracto es adecuado para ser

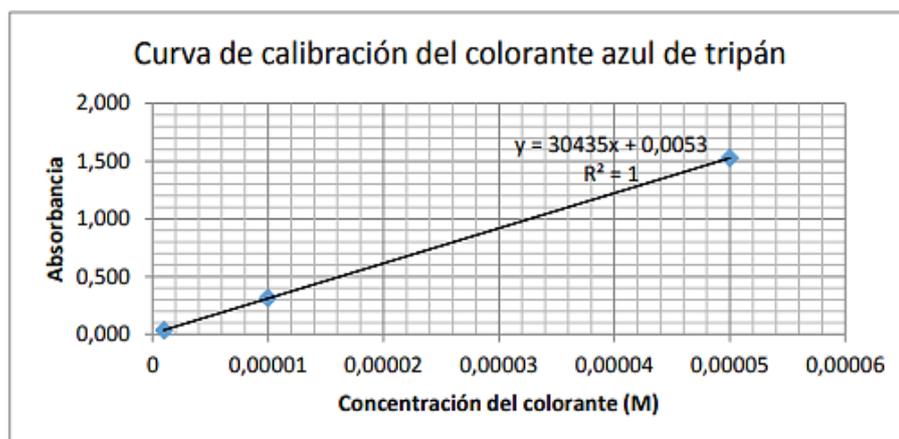
incorporado en cosméticos y productos de protección solar, en la literatura no se han encontrado estudios toxicológicos para este tipo de especies del género *Buddleja*, sin embargo, en el estudio con *M. taxifolia* se establece que la planta presenta un potencial bajo de irritación con un porcentaje de 1.93, este valor en comparación con el obtenido en este ensayo es mucho menor (Costa et al., 2015:pp. 413-418).

### 3.13 Irritabilidad ocular *in vitro*, método CAM-TBS

Para tener un resultado cuantitativo del ensayo de irritabilidad ocular *in vitro*, se empleó el método de membrana coriolantoidea en huevo gallina usando azul tripán como indicador de lesión, para ello se registraron los resultados en absorbancias, las cuales fueron remplazados en la curva de calibración del colorante azul tripán, para conseguir la concentración del colorante en la membrana y mediante la aplicación de una fórmula establecida se determinó la cantidad de colorante que absorbió, por medio de este resultado se pudo clasificar a las sustancias de acuerdo a su potencial de irritación.

La cantidad de azul de tripano que entró en las células podría correlacionarse con la lesión causada por la formulación a la CAM, cada uno de los extractos de las hojas de *Buddleja incana*, a concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500 ppm fueron clasificadas de acuerdo con el valor medio de tres huevos basados en la cantidad de nmoles del colorante absorbido por mg de membrana. (García et al. 2004)

**Figura 8-3:** Curva de calibración del colorante azul de Tripán



Fuente: (Evelyn et al., 2015.p.69)

**Tabla 16-3:** Resultados de la determinación de irritabilidad ocular, CAM-TBS

Muestras	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO nmoles/mg	CLASIFICACIÓN
Extracto de <i>Buddleja incana</i>		
62.5ppm	0.007 ± 0,006	NO IRRITANTE
125 ppm	0.022 ± 0,003	NO IRRITANTE
250 ppm	0.064 ± 0,003	NO IRRITANTE
500 ppm	0.088 ± 0,004	NO IRRITANTE
Na OH 0,1 M *	0.469 ± 0,089	IRRITANTE SEVERO
Agua destilada**	0.001 ± 0,001	NO IRRITANTE

\*control positivo \*\* control negativo

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

La tabla anterior muestra los resultados obtenidos de la prueba de irritabilidad ocular *in vitro* mediante el método CAM-TBS, en este se puede apreciar que la cantidad de colorante absorbido en nmoles por mg de membrana para todas las concentraciones del extracto de *Buddleja incana* son menores a 0,100 nmoles, por lo tanto, es clasificada como no irritante.

Para tener un mejor control del ensayo se probó una solución de Na OH 0,1 M, obteniendo una cantidad promedio de colorante absorbido de 0.469 nmoles por mg de membrana, lo que confirma el potencial irritante que presenta esta sustancia, en bibliografía este valor encontrado para el Na OH 0,1 M es de 0.494 nmoles por mg de membrana (Inocente, et al, 2014:pp.27-33).

Mediante este ensayo se confirmó que el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, no es irritante, por lo que puede ser incorporado en formulaciones de protección solar sin causar problemas, además no existe estudios de toxicidad para esta especie. Sin embargo, los datos obtenidos en este ensayo son muy similares a los obtenidos por el método HET-CAM, por lo que se podrían considerar dichos extractos seguros para uso cosmético ya que, al pasar por las pruebas de toxicidad, demuestran que no son irritantes para los ojos y la piel.

Además, hay que considerar que a medida que aumenta la concentración del extracto, aumenta la cantidad de colorante absorbido y, en consecuencia, aumenta su índice de irritación. Además, debido a que la concentración más alta analizada presenta una cantidad muy baja en comparación con el control positivo, los extractos siguen considerándose como no irritantes.

### 3.14 Potencial de Genotoxicidad (test de micronúcleos) MNs

La determinación de la seguridad de los productos naturales constituye un punto muy importante, ya que la toxicidad representa un obstáculo importante en el desarrollo de nuevos productos, es así que mediante el test de micronúcleos se evaluó, el potencial genotóxico del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, a diferentes concentraciones, obteniendo los resultados descritos en la tabla 11-4 expresados como índice mitótico (IM) e índice de micronúcleos (MCN) para cada una de las concentraciones ensayadas.

**Tabla 17-3:** Resultados del ensayo del test de micronúcleos

<b>Grupo experimental Extracto de <i>Buddleja incana</i></b>	<b>Micronúcleos (MCN)</b>	<b>Índice mitótico (IM)</b>
0.05 % p/v	0	21.5 ± 8.2
0.10 % p/v	0	25.25 ± 2.7
0.20 % p/v	0	24.75 ± 4.4
0.40 % p/v	0	26.5 ± 6.45
Agua grifo**	0.5 ± 0.57	27.25 ± 4.5
Etanol *	1.75 ± 1.25	2.75 ± 1.70
Control positivo * Control negativo **		

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

El ensayo fue realizado sometiendo la región meristemática y la región F1, de las raíces de *Vicia faba* variedad Minor, al extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, durante 48 horas. Para cada uno de los tratamientos se contaron un total de 3000 células, las cuales fueron reportadas según su fase de división, de igual forma se reportó la cantidad de células interfásicas con presencia de micronúcleos, para luego realizar los cálculos respectivos para cada uno de los tratamientos.

Los resultados indican que las raíces expuestas a los extractos de *Buddleja incana* a diferentes concentraciones no muestran diferencia a simple vista con el control negativo agua, a las 48 horas de tratamiento, la región F1 de las raíces tratadas con los extractos no manifestaron un efecto genotóxico en ninguna de las concentraciones ya que no hay un aumento en la frecuencia de micronúcleos.

De igual manera se evaluó el índice mitótico, para cada uno de los tratamientos, dicho índice determina los niveles de citotoxicidad de un compuesto, refleja la actividad mitótica de los meristemas de raíz, y la disminución de su valor es un signo de citotoxicidad. En este ensayo el

índice mitótico obtenido tanto para los extractos, como para el control negativo no difieren significativamente y se encuentran dentro del rango óptimo de división celular para *Vicia faba*, entre el 25 a 30 %, en comparación con el control positivo etanol, el cual presentó un efecto citotóxico al verse reducida la división celular, alcanzando un índice de división muy bajo de 2.75.

Este ensayo es considerado muy importante en este estudio ya que, al contener el extracto *Buddleja incana* fenoles y flavonoides, metabolitos útiles como fotoprotectores, con una amplia actividad biológica; varios estudios bibliográficos han demostrado que estos tienen la capacidad de actuar como mutagénicos o prooxidantes, dependiendo del número y la posición de los grupos hidroxilo en el anillo A y B. La presencia de hidroxilos de fenol en las posiciones 3 'y 4' del anillo B e hidroxilos libres o grupos metoxilo en la posición 7 del anillo A, hacen que actúen como compuestos mutágenos. Sin embargo, en este caso el extracto de *Buddleja incana*, no produjo citotoxicidad o mutagenicidad en ninguna de las concentraciones ensayadas, esto puede deberse a la presencia de flavonoides antimutagénicos que no poseen grupos OH en posiciones catecólicas o pirogálica (Macêdo et al., 2008:pp.509-516).

Entre las plantas superiores, *Allium cepa* se considera como un organismo de prueba de genotoxicidad eficiente. Esta eficacia se basa en las características de la cinética de proliferación de la planta, el rápido crecimiento de sus raíces, la gran cantidad de células en división, la alta tolerancia a diferentes condiciones de cultivo, la disponibilidad durante todo el año, la facilidad de manejo y el pequeño número ( $2n = 16$ ) y gran tamaño de sus cromosomas (Fiskesjö, 1985; Leme y Marin-Morales, 2009).

### **3.15 Análisis estadístico**

En el análisis estadístico de genotoxicidad, se evaluó los datos del índice mitótico e índice de micronúcleos. Para el análisis del índice mitótico se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene, en el cual se estableció que los datos son normales; posteriormente se realizó el test ANOVA de un factor, alcanzando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , con lo cual se estableció que, si existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados.

Para conocer dicha diferencia entre los tratamientos se realizó el test de Tukey que permite realizar comparaciones múltiples y concluir, que el único tratamiento diferente a los demás corresponde al control positivo etanol en la que la división celular se ve reducida significativamente en comparación con el agua y los extractos de *Buddleja incana* en todas sus concentraciones (tabla 18-3 y 19-3).

En cuanto al índice de micronúcleos se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov y se obtuvo que los datos no provienen de una distribución normal, por lo tanto, fueron analizados mediante una prueba no paramétrica Chi-Cuadrado, en la cual se obtuvo un p valor de 0.055, concluyendo que no existe diferencia significativa entre los tratamientos en análisis, esto debido a que el número de micronúcleos encontrados en el control positivo fueron muy reducidos por lo que podemos establecer que el etanol no genera una cantidad de micronúcleos considerable.(tabla 20-3)

**Tabla 18-3:** Test de ANOVA ensayo de genotoxicidad, índice mitótico

ANOVA					
IM					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1736,333	5	347,267	13,050	,000
Dentro de grupos	479,000	18	26,611		
Total	2215,333	23			

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 19-3:** Test de Tukey ensayo de genotoxicidad, índice mitótico

IM			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
CONTROL POSITIVO	4	2,75	
0.05 B.I	4		21,50
0.20 B.I	4		24,75
0.10 B.I.	4		25,25
0.40 B.I	4		26,50
CONTROL NEGATIVO	4		27,25
Sig.		1,000	,623

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 20-3:** Test de chi-cuadrado ensayo de genotoxicidad, test micronúcleos.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	24,667 <sup>a</sup>	15	,055
Razón de verosimilitud	20,767	15	,144
Asociación lineal por lineal	7,491	1	,006
N de casos válidos	24		

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

## CONCLUSIONES

1. Se determinaron las actividades fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, alcanzando buenos resultados en cada uno de los ensayos efectuados, por lo que se establece que estas pruebas *in vitro* son aptas para evaluar diferentes formulaciones y sobretodo siguen lineamientos éticos para estudios científicos.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Buddleja incana* presenta actividad fotoprotectora *in vitro* frente a la radiación UVB, alcanzando la supervivencia de las UFC hasta los 90 minutos de exposición, su capacidad fotoprotectora depende directamente de la concentración, alcanzando un mayor porcentaje de supervivencia de las bacterias a una concentración de 2000 ppm, y comparando con los controles positivos mediante un análisis estadístico con la prueba de Tukey se establece que no existen diferencias significativas a las mismas concentraciones.
3. Los metabolitos a los cuales se les atribuye la actividad fotoprotectora comprenden principalmente los compuestos fenólicos, flavonoides, y otros metabolitos propios de la especie los cuales a través de acciones sinérgicas o de manera individual, pueden actuar como filtro solares naturales efectivos, seguros y accesibles a la población e incluso ser amigables con el medio ambiente, con lo cual se convierte *Buddleja incana* en una planta interesantes para la formulación de productos naturales para el cuidado de la piel.
4. Mediante el ensayo de membrana coriolantoidea en huevo de gallina se determinó la irritabilidad ocular *in vitro* que puede inducir el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*, encontrándose que todas las formulaciones ensayadas fueron clasificadas como no irritantes, por lo que se establece que el extracto puede ser incorporado de manera segura en diferentes formulaciones.
5. En el ensayo de genotoxicidad *in vitro* no se identificó la presencia de micronúcleos en las células de *Vicia faba* variedad Minor en ninguna de las concentraciones ensayadas, determinando de igual manera que el porcentaje de división celular se encuentra dentro de los rangos establecidos por lo que se establece que el extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* no es genotóxico y, por tanto, se puede aplicar de manera regular.

## RECOMENDACIONES

- Para el ensayo de fotoprotección *in vitro* mediante el método de muerte celular inducida a *E. coli*, se recomienda realizar las diluciones necesarias a la suspensión bacteriana, con el propósito de identificar y contabilizar fácilmente las UFC sobrevivientes, especialmente en el tiempo 0 y 30, al contener una concentración bacteriana alta.
- Durante la preparación de la suspensión bacteriana y la siembra respectiva para cada uno de los tiempos descritos en el ensayo de fotoprotección *in vitro*, se recomienda que las suspensiones bacterianas sean homogenizadas adecuadamente, de tal manera que la muestra tomada para la siembra contenga una cantidad de bacterianas representativa de toda la suspensión con lo cual se asegura la obtención de datos confiables.
- Se recomienda continuar investigando sobre *Buddleja incana*, con la finalidad de identificar estructuralmente los metabolitos presentes, responsables de su actividad fotoprotectora, para su posterior incorporación en nuevos productos naturales de fotoprotección, más seguros, efectivos y accesibles a la comunidad.
- Durante el ensayo de irritabilidad ocular *in vitro*, por el método de membrana coriolantoidea, se recomienda retirar cuidadosamente la membrana externa para evitar daños previos que pudieran intervenir en los resultados del ensayo como ruptura de los vasos, sangrado o coagulación.
- En el ensayo de genotoxicidad se recomienda seguir la metodología descrita de tal manera, que se obtengan cortes adecuados de las raíces que permitan apreciar al microscopio las células en diferentes fases en división, así como aquellas con presencia de micronúcleos.

## BIBLIOGRAFÍA

**Abal, G.** "Fundamentos de Energía Solar RADIACION SOLAR" [en línea], [Consulta: 14 marzo 2018]. Disponible en: [https://eva.fing.edu.uy/pluginfile.php/54561/mod\\_resource/content/1/Curso-FES-Radiacion-solar-v2.3.pdf](https://eva.fing.edu.uy/pluginfile.php/54561/mod_resource/content/1/Curso-FES-Radiacion-solar-v2.3.pdf).

**Aljamal, S., Griffith, J.L. y Lim, H.W.** "Photoprotection in ethnic skin". *Dermatologica Sinica* [en línea], 2014 vol. 32, no. 4, pp. 217-224. [Consulta: 20 marzo 2018]. ISSN 1027-8117. DOI 10.1016/J.DSI.2014.09.001. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1027811714000494>.

**Araujo Soto, A.** "Artículo Cienciacierta #34". [en línea]. [Consulta: 28 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC34/9.html#.Wrp4wIjwbIV>.

**ANVISA, A.N. de V.S.** "Guía para la aprobación de la seguridad de los productos cosméticos". [en línea], 2012 vol. 2. [Consulta: 28 marzo 2018]. Disponible en: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guía+de+Estabilidad+de+Productos+Cosméticos/dd40ebf0-b9a2-4316-a6b4-818cac57f6de>.

**Arellano-Mendoza, M. y Stengel, F.** "Current challenges in photoprotection". *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2017, vol. 76, no. 3, pp. S91-S99. [Consulta: 21 marzo 2018]. ISSN 0190-9622. DOI 10.1016/J.JAAD.2016.09.040. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962216308829>.

**Asociación argentina de dermatología, Vargas, N., Martínez, L., Agudelo, C. y Ortiz, I.** *Revista argentina de dermatología*. [en línea], 2013, (Argentina) S.l.: Asociación Argentina de Dermatología. [Consulta: 21 marzo 2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-300X2013000300002&lang=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2013000300002&lang=pt).

**Avila A, J.G. y Romo de Vivar, A.** "Triterpenoid saponins and other glycosides from *Buddleja scordioides*". *Biochemical Systematics and Ecology* [en línea], 2002, (Mexico) vol. 30, no. 10, pp. 1003-1005. [Consulta: 26 marzo 2018]. ISSN 0305-1978. DOI 10.1016/S0305-1978(02)00032-7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197802000327#!>

**Avila Acevedo, J.G., Castañeda, C.M., Benitez, F.J., Durán, D.A., Barroso, V.R., Martínez, C.G., Muñoz, L.J.L., Martínez, C.A. y Romo de Vivar, A.** "Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*". *Fitoterapia* [en línea], 2005 vol. 76, no. 3-4, pp. 301-309. [Consulta: 29 marzo 2018]. ISSN 0367-326X. DOI 10.1016/J.FITOTE.2005.03.009. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X05000535>.

**Benavides, Perez, Poma, R.** Científica Vol. 8 N° 1 by Biblioteca Científica - issuu. [en línea].2012 [Consulta: 6 mayo 2018]. Disponible en: <https://issuu.com/bibliotecacientifica/docs/cientifica-v8n1/24>.

**Bender, C., Partecke, I., Kindel, E., Döring, F., Lademann, J., Heidecke, D., Kramer, A. y Hübner, N.** "The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma". *Toxicology in Vitro* [en línea],2011 vol. 25, no. 2, pp. 530-537. [Consulta: 28 marzo 2018]. ISSN 0887-2333. DOI 10.1016/J.TIV.2010.11.012. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233310003048>.

**Bendová, H., Akerman, J., Krejčí, A., Kubáč, L., Jírová, D., Kejlová, K., Kolářová, H., Brabec, M. y Malý, M.** "In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor" *Toxicology in Vitro* [en línea], 2007vol. 21, no. 7, pp. 1268-1275. [Consulta: 26 abril 2018]. ISSN 0887-2333. DOI 10.1016/J.TIV.2007.08.022. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233307002342>.

**Carrasco Ríos, L.** "EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA-B EN PLANTAS". *Idesia (Arica)* [en línea],2009 vol. 27, no. 3, pp. 59-76. [Consulta: 6 mayo 2018]. ISSN 0718-3429. DOI 10.4067/S0718-34292009000300009. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-34292009000300009&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292009000300009&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

**Cestari, T. y Buster, K.** "Photoprotection in specific populations: Children and people of color". *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2017 vol. 76, no. 3, pp. S110-S121. [Consulta: 20 marzo 2018]. ISSN 0190-9622. DOI 10.1016/J.JAAD.2016.09.039. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962216308817>.

**Choquenot, B., Couteau, C., Papis, E. y Coiffard, L.J.M.** "Quercetin and Rutin as Potential Sunscreen Agents: Determination of Efficacy by an in Vitro Method". *Journal of Natural Products* [en línea], 2008 vol. 71, no. 6, pp. 1117-1118. [Consulta: 22 marzo 2018]. ISSN 0163-3864. DOI 10.1021/np7007297. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512988>.

**Conic, R.Z., Cabrera, C.I., Khorana, A.A. y Gastman, B.R.** "Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database". *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2018 vol. 78, no. 1, pp. 40-46.e7. [Consulta: 26 abril 2018]. ISSN 01909622. DOI 10.1016/j.jaad.2017.08.039. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962217323009>.

**Corrêa, A.X., Cotellet, S., Millet, M., Somensi, C.A., Wagner, T.M. y Radetski, C.M.** "Genotoxicity assessment of particulate matter emitted from heavy-duty diesel-powered vehicles using the in vivo *Vicia faba* L. micronucleus test" *Ecotoxicology and Environmental Safety* [en línea], 2016 vol. 127, pp. 199-204. [Consulta: 30 marzo 2018]. ISSN 0147-6513. DOI 10.1016/J.ECOENV.2016.01.026. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651316300264>.

**Costa, S.C.C., Detoni, C.B., Branco, C.R.C., Botura, M.B. y Branco, A.** "In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations". *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2015 vol. 25, no. 4, pp. 413-418. [Consulta: 26 febrero 2018]. ISSN 0102-695X. DOI 10.1016/J.BJP.2015.07.013. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X15001349>.

**Craythorne, E. y Al-Niami, F.** "Skin cancer". *Medicine* [en línea], 2017 vol. 45, no. 7, pp. 431-434. [Consulta: 19 marzo 2018]. ISSN 1357-3039. DOI 10.1016/J.MPMED.2017.04.003. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357303917300932>.

**D’orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. y Scott, T.** "UV radiation and the skin". *International journal of molecular sciences* [en línea], 2013 vol. 14, no. 6, pp. 12222-48. [Consulta: 15 marzo 2018]. ISSN 1422-0067. DOI 10.3390/ijms140612222. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749111>.

**De Ávila, R.I., De Sousa Vieira, M., Gaeti, M.P., Moreira, L.C., De Brito Rodrigues, L., De Oliveira, G.A., Batista, A.C., Vinhal, D.C., Menegatti, R. y Valadares, M.C.** "Toxicity evaluation of the photoprotective compound LQFM048: Eye irritation, skin toxicity and genotoxic endpoints" *Toxicology* [en línea], 2017 vol. 376, pp. 83-93. [Consulta: 28 marzo 2018]. ISSN 0300-483X. DOI 10.1016/J.TOX.2016.04.007. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X16300373#fig0010>.

**De Lima-Saraiva, S.R.G., Oliveira, F.G. da S., Junior, R.G. de O., Araújo, C. de S., De Oliveira, A.P., Pacheco, A.G.M., Rolim, L.A., De Amorim, E.L.C., César, F.C.S. y Almeida, J.R.G. da S.** "Chemical Analysis and Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial, and Photoprotective Activities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae)". *TheScientificWorldJournal* [en línea], 2017 vol. 2017, pp. 1713921. [Consulta: 29 marzo 2018]. ISSN 1537-744X. DOI 10.1155/2017/1713921. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29124118>.

**Dinkova-Kostova, A.** "Phytochemicals as Protectors Against Ultraviolet Radiation: Versatility of Effects and Mechanisms". *Planta Medica* [en línea], 2008 vol. 74, no. 13, pp. 1548-1559. [Consulta: 22 marzo 2018]. ISSN 0032-0943. DOI 10.1055/s-2008-1081296. Disponible en: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2008-1081296>.

**El-boury, S., Couteau, C., Boulande, L., Papis, E. y Coiffard, L.J.** "Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method". *International Journal of Pharmaceutics* [en línea], 2007 vol. 340, no. 1-2, pp. 1-5. [Consulta: 18 abril 2018]. ISSN 0378-5173. DOI 10.1016/J.IJP.2007.05.047. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307004589?via%3Dihub>.

**Eo vallejo, Vargas, Martínez, LM.** *Revista argentina de dermatología* [en línea], 2010 vol. 94, no. 3, pp. 1-61. [Consulta: 14 marzo 2018]. ISSN 0325-7541. DOI 10.7775/rac. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-300X2013000300002&lang=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2013000300002&lang=pt).

**Eveling, B., Rosario, D. y Espinoza, T.** Estandarización y validación del método HET CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética. Universidad de San Martín de Porres. Facultad de Medicina Humana. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Peru. 2015 ( [en línea], [Consulta: 28 marzo 2018]. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4474/Taype\\_ee.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4474/Taype_ee.pdf?sequence=1).

**EXA.** "EXA - Monitor nacional de radiacion ultravioleta". *MONITOR NACIONAL DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA* [en línea]. 2009 [Consulta: 6 mayo 2018]. Disponible en: <http://uv.exa.ec/>.

**FDA.** Laboratory Methods - BAM R42: McFarland Nephelometer. 2001 [en línea], [Consulta: 28 marzo 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm062247.htm>.

**Ferraro, M.J. y National Committee For Clinical Laboratory Standards.** "*Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : twelfth informational supplement*"2002 [en línea]. S.I.: National Committee for Clinical Laboratory Standards. [Consulta: 28 marzo 2018]. ISBN 1562384546. Disponible en: [https://issuu.com/laboratorio\\_hu/docs/manual\\_\\_de\\_laboratorio\\_para\\_la\\_identificacion\\_\\_y\\_p/311](https://issuu.com/laboratorio_hu/docs/manual__de_laboratorio_para_la_identificacion__y_p/311).

**Franco, G.N.** "Histología de la piel" . *edigraphic.com MG Rev Fac Med UNAM* [en línea], vol. 46, no. 4. [Consulta: 16 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-4/RFM46403.pdf>.

**García-Bores, A.M., Espinosa-González, A.M., Reyna-Campos, A., Cruz-Toscano, S., Benítez-Flores, J.C., Hernández-Delgado, C.T., Flores-Maya, S., Urzúa-Meza, M., Peñalosa-Castro, I., Céspedes-Acuña, C.L. y Avila-Acevedo, J.G.** "Lippia graveolens photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis" *Journal of*

***Photochemistry and Photobiology B: Biology*** [en línea], 2017 vol. 167, pp. 72-81. [Consulta: 29 marzo 2018]. ISSN 1011-1344. DOI 10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.12.014. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416308922>.

**García-Bores, A.M., Espinosa-González, A.M., Reyna-Campos, A., Cruz-Toscano, S., Benítez-Flores, J.C., Hernández-Delgado, C.T., Flores-Maya, S., Urzúa-Meza, M., Peñalosa-Castro, I., Céspedes-Acuña, C.L. y Avila-Acevedo, J.G.** "Lippia graveolens photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis". ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*** [en línea], 2017 vol. 167, pp. 72-81. [Consulta: 30 marzo 2018]. ISSN 1011-1344. DOI 10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.12.014. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416308922>.

**García, L., Gleiby, M., Montes De Oca, N. y Hidalgo, L.** "Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*". ***Revista de Toxicología*** [en línea], 2004 vol. 21, no. 2-3, pp. 103-107. ISSN 02127113. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8144220868&partnerID=tZOtx3y1>.

**Gilaberte, Y. y González, S.** "Novedades en fotoprotección". ***Actas Dermo-Sifiliográficas*** [en línea], 2010 vol. 101, no. 8, pp. 659-672. [Consulta: 26 febrero 2018]. ISSN 0001-7310. DOI 10.1016/J.AD.2010.04.003. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001731010002760#!>

**González-Púmariega, M., Tamayo, M.V. y Sánchez-Lamar, Á.** "LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA. SU EFECTO DAÑINO Y CONSECUENCIAS PARA LA SALUD HUMANA" [en línea], [Consulta: 14 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/194/v/v18-2/06.pdf>.

**González, M. y Castro, I.** "El sol: ¿enemigo de nuestra piel" ***Medisan*** [en línea], 2010 vol. 14, no. 6, pp. 825-837. [Consulta: 26 febrero 2018]. ISSN 1029-3019. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30192010000600014&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192010000600014&lng=es&nrm=iso&tlng=es).

**González Bosquet, L.** *Offarm* [en línea]. S.l.: Doyma. [Consulta: 19 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-exposicion-solar-13088615?referer=buscador>.

**Guy, G.P., Machlin, S.R., Ekwueme, D.U. y Yabroff, K.R.** "Prevalence and Costs of Skin Cancer Treatment in the U.S., 2002–2006 and 2007–2011". *American Journal of Preventive Medicine* [en línea], 2015 vol. 48, no. 2, pp. 183-187. [Consulta: 26 abril 2018]. ISSN 07493797. DOI 10.1016/j.amepre.2014.08.036. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749379714005108>.

**Hernández, K., Morera, R. y Wright, J.** "TÓPICOS METEOROLÓGICOS Y OCEANOGRÁFICOS Medición y cálculo del índice ultravioleta en Costa Rica". [en línea], [Consulta: 15 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/21918/RevistaTopicos2014-2-art3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

**Houghton, P.J.** Ethnopharmacology of some Buddleja species. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 1984 vol. 11, no. 3, pp. 293-308. [Consulta: 23 marzo 2018]. ISSN 0378-8741. DOI 10.1016/0378-8741(84)90075-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874184900758>.

**Huang, S.-H. y NG, L.-T.** "Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan". *Journal of Food Composition and Analysis* [en línea], 2012 vol. 26, no. 1-2, pp. 122-127. [Consulta: 26 febrero 2018]. ISSN 0889-1575. DOI 10.1016/J.JFCA.2012.03.009. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157512000506?via%3Dihub>.

**Hwang, E., Park, S.-Y., Lee, H.J., Sun, Z., Lee, T.Y., Song, H.G., Shin, H.-S. y YI, T.H.** *Vigna angularis* Water Extracts Protect Against Ultraviolet B-Exposed Skin Aging *In Vitro* and *In Vivo*. *Journal of Medicinal Food* [en línea], 2014 vol. 17, no. 12, pp. 1339-1349. [Consulta: 22 marzo 2018]. ISSN 1096-620X. DOI 10.1089/jmf.2013.3017. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25369199>.

**Inocente, M., Tomas, G., Huamán, J., Palomino, M. y Bonilla, P.** Compuestos fenólicos , actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de tumbo serrano ( *Passiflora mollissima* HBK ). *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* [en línea], 2014 vol. 17, no. 2, pp. 27-33. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/11327/10157>.

**IQBAL, M.** "Vicia faba bioassay for environmental toxicity monitoring: A review". *Chemosphere* [en línea], 2016 vol. 144, pp. 785-802. [Consulta: 26 marzo 2018]. ISSN 0045-6535. DOI 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.09.048. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653515301375>.

**Jallad, K.N.** "Chemical characterization of sunscreens composition and its related potential adverse health effects". *Journal of Cosmetic Dermatology* [en línea], 2017 vol. 16, no. 3, pp. 353-357. [Consulta: 21 marzo 2018]. ISSN 14732130. DOI 10.1111/jocd.12282. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596093>.

**Koneman, E.;** et al. "Diagnóstico Microbiológico. 6<sup>a</sup> ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana SA", 2006. pp. 932-933

**Korać, R.R. y Khambholja, K.M.** "Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation". *Pharmacognosy reviews* [en línea], 2011 vol. 5, no. 10, pp. 164-73. [Consulta: 21 marzo 2018]. ISSN 0976-2787. DOI 10.4103/0973-7847.91114. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279374>.

**Lagarto, A., Vega, R., Guerra, I. y González, R.** "In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test". *Toxicology in Vitro* [en línea], 2006 vol. 20, no. 5, pp. 699-702. [Consulta: 28 marzo 2018]. ISSN 0887-2333. DOI 10.1016/J.TIV.2005.10.003. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233305002195?via%3Dihub>.

**Labre Panimboza, L.V.** Estudio de la actividad Fotoprotectora de la *Buddleja incana*, en Fototipos de piel III para la elaboración de un protector solar. Escuela Superior Politecnica de Chomborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. 2015 [en línea], [Consulta: 6 mayo 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4021?mode=full>.

**López-Camarillo, C., Ocampo, E.A., Casamichana, M.L., Pérez-Plasencia, C., Álvarez-Sánchez, E. y Marchat, L.A.** "Protein kinases and transcription factors activation in response to UV-radiation of skin: implications for carcinogenesis" *International journal of molecular sciences* [en línea], 2012 vol. 13, no. 1, pp. 142-72. [Consulta: 19 marzo 2018]. ISSN 1422-0067. DOI 10.3390/ijms13010142. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312244>.

**López-Nevoti, C.M.C.M.M.A.** *Oncología*. 2006 [en línea]. S.l.: Ediciones Tutor. [Consulta: 14 marzo 2018]. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-48352006000700003&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352006000700003&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

**López Figueroa, F.** "Implicaciones dermatológicas del cambio climático y de la disminución de la capa de ozono". *Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2011 vol. 102, no. 5, pp. 311-315. [Consulta: 26 febrero 2018]. ISSN 0001-7310. DOI 10.1016/J.AD.2010.12.006. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001731011000238?via%3Dihub>.

**Losquadro, W.D.** "Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer" *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* [en línea], 2017 vol. 25, no. 3, pp. 283-289. [Consulta: 15 marzo 2018]. ISSN 1064-7406. DOI 10.1016/J.FSC.2017.03.001. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1064740617300263>.

**Llangua** "Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de quishuar (*Buddleja incana*), aliso (*Alnus acuminata*) y romerillo (*Hypericum laricifolium*) localizados en 3 zonas geográficas diferentes" 2014 Escuela Superior Politecnica de Chomborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 6 mayo 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3427/1/56T00446.pdf>.

**Macêdo, M.F.S., Sisenando, H.A.A.A.C.N., Queiroz, J.D.F., Argolo, A.C.C., Saturnino, A.C.R.D., Coelho, L.C.B.B. y Medeiros, S.R.B.** "Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of Bauhinia monandra leaves". *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2008 vol. 18, no. 4, pp. 509-516. [Consulta: 10 abril 2018]. ISSN 0102-695X. DOI 10.1590/S0102-695X2008000400002. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2008000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

**Maddodi, N., Jayanthi, A. y Setaluri, V.** "Shining light on skin pigmentation: the darker and the brighter side of effects of UV radiation". *Photochemistry and photobiology* [en línea], 2012 vol. 88, no. 5, pp. 1075-82. [Consulta: 19 marzo 2018]. ISSN 1751-1097. DOI 10.1111/j.1751-1097.2012.01138.x. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404235>.

**Maisache, D.** "Latacunga y Riobamba presentan índices altos de radiación solar | El Comercio". 2017 [en línea], [Consulta: 6 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.elcomercio.com/actualidad/latacunga-riobamba-radiacionsolar-inamhi-clima.html>.

**Marín, D. y Del Pozo, A.** *Offarm* [en línea]. S.l.: Doyma. [Consulta: 16 marzo 2018 a]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-pigmentacion-piel-i-melaninas-conceptos-13070745?referer=buscador>.

**Maske, P.P., Lokapure, S.G., Nimbalkar, D., Malavi, S. y D'souza, J.I.** ". In vitro determination of sun protection factor and chemical stability of Rosa kordesii extract gel". *Journal of Pharmacy Research* [en línea], 2013 vol. 7, no. 6, pp. 520-524. [Consulta: 15 marzo 2018]. ISSN 0974-6943. DOI 10.1016/J.JOPR.2013.05.021. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0974694313002697#bib6>.

**Mena, Y., Mosquera, D.M.G., Díaz, A.V., Espín, A.P., Alfonso, O.C. y Román, R.E.** *Revista cubana de plantas medicinales*. 2016 [en línea]. S.l.: Editorial Ciencias Médicas. [Consulta: 18 abril 2018]. Disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/390/198>.

**Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C. dos, Coube, C.S. y Leitão, S.G.** "Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method". *Phytotherapy Research* [en línea], 2001 vol. 15, no. 2, pp. 127-130. [Consulta: 27 febrero 2018]. ISSN 0951418X. DOI 10.1002/ptr.687. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.687>.

**Miranda Martinez, Migdalia; & Cuellar, A.** Farmacognosia y Productos Naturales. Cuba : Félix Varela, 2010. págs. 141,207,291-292.

**Mishra, A.K., Mishra, A., Verma, A. y Chattopadhyay, P.** "Effects of Calendula Essential Oil-Based Cream on Biochemical Parameters of Skin of Albino Rats against Ultraviolet B Radiation". *Scientia pharmaceutica* [en línea], 2012 vol. 80, no. 3, pp. 669-83. [Consulta: 21 marzo 2018]. ISSN 2218-0532. DOI 10.3797/scipharm.1112-18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23008814>.

**Mohan, S. V. y Chang, A.L.S.** "Advanced Basal Cell Carcinoma: Epidemiology and Therapeutic Innovations". *Current Dermatology Reports* [en línea], 2014 vol. 3, no. 1, pp. 40-45. [Consulta: 26 abril 2018]. ISSN 2162-4933. DOI 10.1007/s13671-014-0069-y. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13671-014-0069-y>.

**Molineros, D.** El Telégrafo - Los casos de cáncer de piel en la capital van en ascenso. *08 de abril de 2017* [en línea]. [Consulta: 26 abril 2018]. Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/quito/11/los-casos-de-cancer-de-piel-en-la-capital-van-en-ascenso>.

**Murillo, G.. P.U.. T.E.. V.M.. G.G.. P.J.** *Revista de toxicología organo oficial de la Asociacion Española de Toxicología*. [en línea].2003 S.l.: Asociación Española de Toxicología. [Consulta: 28 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/919/91920305/>.

**Navas, L.G. y Navas, G.G.** "Uso de cámaras de bronceado y cáncer de piel Indoor tanning and skin cancer". [en línea], 2017 vol. 26, no. 1, pp. 22-29. [Consulta: 20 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rcsp/v26n1/1409-1429-rcsp-26-01-00022.pdf>.

**Nobre, C.P., Raffin, F.N. y Moura, T.F.A.** " Estandarización de extractos de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) por medio de la determinación del contenido de flavonoides totales." *Acta Farmacéutica Bonaerense* [en línea], 2005 vol. 24, n.º 4. [Consulta: 13 abril 2018]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6781>.

**Noreen, H., Semmar, N., Farman, M. y Mccullagh, J.S.O.** "Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*". *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [en línea], 2017 vol. 10, no. 8, pp. 792-801. [Consulta: 26 febrero 2018]. ISSN 1995-7645. DOI 10.1016/J.APJTM.2017.07.024. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517304790>.

**OECD, Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test** [en línea]. 2017 S.I.: OECD Publishing. [Consulta: 26 marzo 2018]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. ISBN 9789264264861. Disponible en: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test\\_9789264264861-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en).

OMS | Radiación ultravioleta. **WHO** [en línea], 2016. [Consulta: 14 marzo 2018]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/ultraviolet\\_radiation/es/](http://www.who.int/topics/ultraviolet_radiation/es/).

Organización Mundial de la Salud Organización Meteorológica Mundial Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente Comisión Internacional de Protección contra la Radiación no Ionizante. [en línea], [sin fecha]. [Consulta: 14 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/uv/publications/en/uvispa.pdf>.

**Ravnbak, M.H.** "Objective determination of Fitzpatrick skin type". *Danish medical bulletin* [en línea], 2010 vol. 57, no. 8, pp. B4153. [Consulta: 19 marzo 2018]. ISSN 1603-9629. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682135>.

**Reis Mansur, M., Leitão, S.G., Cerqueira-Coutinho, C., Vermelho, A.B., Silva, R.S., Presgrave, O.A.F., LEitão, Á.A.C., Leitão, G.G., Ricci-Júnior, E. y Santos, E.P.** "In vitro and

in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts". *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2016 vol. 26, no. 2, pp. 251-258. [Consulta: 15 marzo 2018]. ISSN 0102-695X. DOI 10.1016/J.BJP.2015.11.006. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X16000041#bib0125>.

**Reyes, E. y Vitale, M.A.** "Avances en fotoprotección. Mecanismos moleculares implicados". *Piel* [en línea], 2013 vol. 28, no. 4, pp. 235-247. [Consulta: 15 marzo 2018]. ISSN 0213-9251. DOI 10.1016/J.PIEL.2012.04.011. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213925112001943?via%3Dihub>.

**Reynel C, J.M.** "Arboles de los ecosistemas forestales andinos by Francisco Garin" - issuu. [en línea]. [Consulta: 26 marzo 2018]. Disponible en: [https://issuu.com/heliconcus/docs/arboles\\_de\\_los\\_ecosistemas\\_forestal](https://issuu.com/heliconcus/docs/arboles_de_los_ecosistemas_forestal).

**Rivas, C.B., Acosta, J. de la V., Díaz, N.W. y Zapata, E.P.** *Revista cubana de plantas medicinales*. 2014 [en línea]. S.l.: Editorial Ciencias Médicas. [Consulta: 19 abril 2018]. Disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/155/71>.

**Rodrigues, D., Viotto, A.C., Checchia, R., Gomide, A., Severino, D., Itri, R., Baptista, M.S. y Martines, W.K.** "Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: shelter of lysosomal membrane avoids photodamage". *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* [en línea], 2016 vol. 15, no. 3, pp. 334-50. [Consulta: 22 marzo 2018]. ISSN 1474-9092. DOI 10.1039/c5pp00409h. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26815913>.

**Romanhole, R.C., Ataide, J.A., Moriel, P. y Mazzola, P.G.** "Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin". *International Journal of Cosmetic Science* [en línea], 2015 vol. 37, no. 4, pp. 366-370. [Consulta: 26 febrero 2018]. ISSN 01425463. DOI 10.1111/ics.12219. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12219>.

**Saraf, S. y Kaur, C.D.** "Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations" *Pharmacognosy reviews* [en línea], 2016 vol. 4, no. 7, pp. 1-11. [Consulta: 22 marzo 2018]. ISSN 0973-7847. DOI 10.4103/0973-7847.65319. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228936>.

**Schmidt, C.W.** "Noticias de salud ambieNtal". *Las radiaciones ultravioleta y el cáncer de piel: la ciencia detrás de las restricciones de edad para las camas de bronceado*, 2013 vol. 55, pp. 308-313.

*The Netherlands: i.BioCeuticals* [en línea], 2011. [Consulta: 22 marzo 2018]. Disponible en: [http://ibioceuticals.com/docs/Masquelier.IBC\\_Brochure.pdf](http://ibioceuticals.com/docs/Masquelier.IBC_Brochure.pdf).

**SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO ECUADOR**, [sin fecha]. Inicio - Plan Nacional 2013 - 2017. [en línea]. [Consulta: 2 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/>.

**Silva, R. V., Costa, S.C.C., Branco, C.R.C. y Branco, A.** " In vitro photoprotective activity of the Spondias purpurea L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation". *Industrial Crops and Products* [en línea], 2016 vol. 83, pp. 509-514. [Consulta: 22 marzo 2018]. ISSN 0926-6690. DOI 10.1016/J.INDCROP.2015.12.077. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015306646>.

**Skincancer Foundation** Sunscreens Explained - SkinCancer.org. 2012 [en línea]. [Consulta: 26 abril 2018]. Disponible en: <https://www.skincancer.org/prevention/sun-protection/sunscreen/sunscreens-explained>.

**Smaoui, S., Ben Hlima, H., Ben Chobba, I. y Kadri, A.** "Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters." *Arabian Journal of Chemistry* [en línea], 2017 vol. 10, pp. S1216-S1222. [Consulta: 16 abril 2018]. ISSN 1878-5352. DOI 10.1016/J.ARABJC.2013.02.020. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853521300066X>.

**SOLCA**, 2017. Incidencia del cáncer en Quito (2011 - 2013) by SOLCA Quito - Issuu. *septiembre 2017* [en línea]. [Consulta: 26 abril 2018]. Disponible en: [https://issuu.com/solcaquito/docs/rnt\\_2010\\_2013/14?ff=true](https://issuu.com/solcaquito/docs/rnt_2010_2013/14?ff=true).

**SOLCA**, [sin fecha]. Hospital Oncológico Solca Núcleo de Quito - ¿Qué es el cáncer? [en línea]. [Consulta: 26 abril 2018]. Disponible en: <http://www.solcaquito.org.ec/index.php/publicaciones/que-es-el-cancer>.

**Tamboli, F. y More, H.** " Evaluation of antiulcer and antioxidant activity of Barleria gibsoni Dalz. leaves". *Pharmacognosy Research* [en línea], 2016 vol. 8, no. 4, pp. 226. [Consulta: 24 abril 2018]. ISSN 0974-8490. DOI 10.4103/0974-8490.188879. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27695259>.

**Teopicos Ruíz & Pavón**, [sin fecha]. Tropicos | Name - Buddleja incana Ruiz & Pav. [en línea]. [Consulta: 27 abril 2018]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=19000596>.

**Tsuda, T., Kato, Y. y Osawa, T.**, 2000. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS letters* [en línea], vol. 484, no. 3, pp. 207-10. [Consulta: 22 marzo 2018]. ISSN 0014-5793. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078880>.

**Universidad de antioquia. facultad de química farmacéutica., I.R., García P, C.M., Gil g, J.H., Rojano, B.A. y Durango R, D.L., Vitae.** 2009 [en línea]. S.l.: Facultad De Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.[Consulta: 6 abril 2018]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042009000300013&script=sci_abstract&tlng=es).

**US EPA, O.**, [sin fecha]. Cómo calcular el índice UV. [en línea], [Consulta: 15 marzo 2018]. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/espanol/como-calcular-el-indice-uv>.

**Vallejo, N Vargas, LM Martínez C.A.** Revista Argentina de. *Revista argentina de dermatología* [en línea], 2010 vol. 94, no. 3, pp. 1-61.[Consulta: 14 marzo 2018]. ISSN 0325-7541. DOI 10.7775/rac. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-300X2013000300002&lang=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2013000300002&lang=pt).

**Villarpando, D.P.V. y Villalobos, J.** "*Fichas botánicas de especies agroforestales nativas y naturalizadas aptas para tierras altoandinas*", 2010 pp. 1-59.

**Wang, S.Q., Osterwalder, U. y Jung, K.** " Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants". *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2011 vol. 65, no. 3, pp. 525-530. [Consulta: 14 marzo 2018]. ISSN 0190-9622. DOI 10.1016/J.JAAD.2010.07.009. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962210008169>.

**Wilson, S.L., Ahearne, M. y Hopkinson, A.** "An overview of current techniques for ocular toxicity testing". *Toxicology* [en línea], 2015 vol. 327, pp. 32-46. [Consulta: 28 marzo 2018]. ISSN 0300-483X. DOI 10.1016/J.TOX.2014.11.003. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X14002157>.

## ANEXOS

### Anexo A: Análisis estadístico del efecto fotoprotector *in vitro*

**Tabla 1-A:** Resultados del ABC de las sustancias fotoprotectoras a 20 ppm. Supervivencia de *Escherichia coli*.

<b>BLANCO</b>	<b><i>Buddleja incana 20</i></b>	<b>OMC 20</b>	<b>PAMIDATO 20</b>
590000000 ± 163273799	675000000 ± 48218253,8	930000000 ±108512672	855060000 ± 127604080
780000000 ± 163273799	765000000 ± 48218253,8	915000000 ±108512672	990120000 ±127604080
915000000 ± 163273799	690000000 ± 48218253,8	1110000000 ± 108512672	735060000 ± 127604080

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 2-A:** Resultados del ABC de las sustancias fotoprotectoras a 200 ppm. Supervivencia de *Escherichia coli*

<b>BLANCO</b>	<b><i>Buddleja incana 200</i></b>	<b>OMC 200</b>	<b>PAMIDATO 200</b>
590000000 ± 163273799	840120000 ±103905732	1110180000 ±113275334	1155480000 ±62397298
780000000 ± 163273799	660180000 ±103905732	885120000 ±113275334	1065360000 ±62397298
915000000 ± 163273799	660120000 ±103905732	975180000 ±113275334	1035660000 ±62397298

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

**Tabla 3-A:** Resultados del ABC de las sustancias fotoprotectoras a 2000 ppm. Supervivencia de *Escherichia coli*

BLANCO	<i>Buddleja incana</i> 2000	OMC 2000	PAMIDATO 2000
590000000 ± 163273799	1125420000 ±139424203	1411320000 ±135242036	1441080000 ±160488396
780000000 ± 163273799	855360000 ±139424203	1531440000 ±135242036	1125840000 ±160488396
915000000 ± 163273799	930240000 ±139424203	1261500000 ±135242036	1231140000 ±160488396

**Realizado por:** Samaniego, Valeria 2018

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO FOTOPROTECTOR IN VITRO MEDIANTE EL PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS STATICS**

**Descriptivos**

TRATAMIENTO		Estadístico	Error estándar
UFC	blanco	Media	761666666,67
		95% de intervalo de confianza para la media	
		Límite inferior	356072066,04
		Límite superior	1167261267,29
		Media recortada al 5%	.
		Mediana	780000000,00
		Varianza	26658333333333336,000
		Desviación estándar	163273798,674
		Mínimo	6E+8
		Máximo	9E+8
		Rango	325000000
		Rango intercuartil	.
		Asimetría	-,499
		Curtosis	.
	B 20	Media	710000000,00
			27838821,814

	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	590219217,33	
		Límite superior	829780782,67	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		690000000,00	
	Varianza		232500000000 0000,000	
	Desviación estándar		48218253,805	
	Mínimo		7E+8	
	Máximo		8E+8	
	Rango		90000000	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		1,545	1,225
	Curtosis		.	.
P 20	Media		860080000,00	73672249,864
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	543093893,02	
		Límite superior	1177066106,9 8	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		855060000,00	
	Varianza		162828012000 00000,000	
	Desviación estándar		127604079,87 2	
	Mínimo		7E+8	
	Máximo		1E+9	
	Rango		255060000	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		,177	1,225
	Curtosis		.	.
O 20	Media		985000000,00	62649820,431
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	715439579,11	
		Límite superior	1254560420,8 9	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		930000000,00	
	Varianza		117750000000 00000,000	
	Desviación estándar		108512672,07 1	

	Mínimo		9E+8	
	Máximo		1E+9	
	Rango		195000000	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		1,695	1,225
	Curtosis		.	.
B 200	Media		720140000,00	59990002,500
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	462023851,98	
		Límite superior	978256148,02	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		660180000,00	
	Varianza		107964012000 00000,000	
	Desviación estándar		103905732,27 7	
	Mínimo		7E+8	
	Máximo		8E+8	
	Rango		180000000	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		1,732	1,225
	Curtosis		.	.
P 200	Media		1085500000,0 0	36025096,808
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	930496518,88	
		Límite superior	1240503481,1 2	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		1065360000,0 0	
	Varianza		389342280000 0000,000	
	Desviación estándar		62397298,018	
	Mínimo		1E+9	
	Máximo		1E+9	
	Rango		119820000	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		1,301	1,225
	Curtosis		.	.
O 200	Media		990160000,00	65399544,341

	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	708768472,02	
		Límite superior	1271551527,98	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		975180000,00	
	Varianza		1283130120000000,000	
	Desviación estándar		113275333,590	
	Mínimo		9E+8	
	Máximo		1E+9	
	Rango		225060000	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		,585	1,225
	Curtosis		.	.
B 2000	Media		970340000,00	80496601,170
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	623991079,24	
		Límite superior	1316688920,76	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		930240000,00	
	Varianza		1943910840000000,000	
	Desviación estándar		139424203,064	
	Mínimo		9E+8	
	Máximo		1E+9	
	Rango		270060000	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		1,187	1,225
	Curtosis		.	.
P 2000	Media		1266020000,00	92658018,541
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	867344723,59	
		Límite superior	1664695276,41	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		1231140000,00	

	Varianza	257565252000	
		00000,000	
	Desviación estándar	160488395,84	
		2	
	Mínimo	1E+9	
	Máximo	1E+9	
	Rango	315240000	
	Rango intercuartil	.	
	Asimetría	,932	1,225
	Curtosis	.	.
O 2000	Media	1401420000,0	78082026,101
		0	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1065460157,2
			5
		Límite superior	1737379842,7
			5
	Media recortada al 5%	.	
	Mediana	1411320000,0	
		0	
	Varianza	182904084000	
		00000,000	
	Desviación estándar	135242036,36	
		4	
	Mínimo	1E+9	
	Máximo	2E+9	
	Rango	269940000	
	Rango intercuartil	.	
	Asimetría	-,328	1,225
	Curtosis	.	.

#### Pruebas de normalidad

	TRATAMIEN TO	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
UFC	blanco	,211	3	.	,991	3	,814
	B 20	,328	3	.	,871	3	,298
	P 20	,182	3	.	,999	3	,935
	O 20	,361	3	.	,807	3	,132
	B 200	,385	3	.	,750	3	,123
	P 200	,293	3	.	,922	3	,459

O 200	,219	3	.	,987	3	,781
B 2000	,280	3	.	,938	3	,519
P 2000	,253	3	.	,965	3	,638
O 2000	,196	3	.	,996	3	,879

a. Corrección de significación de Lilliefors

### ANOVA

UFC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	141895432332 000000,000	9	157661591480 000000,000	10,649	,000
Dentro de grupos	296096603466 666620,000	20	148048301733 33332,000		
Total	171505092678 6666500,000	29			

**Comparaciones múltiples**

Variabl

e dependiente: UFC

HSD Tukey

(I) TRATA MIENT O	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
blanco	B 20	51666666,667	99347303,850	1,000	-300132845,35	403466178,68
	P 20	-98413333,333	99347303,850	,990	-450212845,35	253386178,68
	O 20	-				
		223333333,333	99347303,850	,459	-575132845,35	128466178,68
		3				
	B 200	41526666,667	99347303,850	1,000	-310272845,35	393326178,68
	P 200	-				
		323833333,333	99347303,850	,087	-675632845,35	27966178,68
		3				
	O 200	-				
		228493333,333	99347303,850	,429	-580292845,35	123306178,68
		3				
B 2000	-					
	208673333,333	99347303,850	,547	-560472845,35	143126178,68	
	3					
P 2000	-					
	504353333,333	99347303,850	,002	-856152845,35	-152553821,32	
	3*					
O 2000	-					
	639753333,333	99347303,850	,000	-991552845,35	-287953821,32	
	3*					
B 20	blanco	-51666666,667	99347303,850	1,000	-403466178,68	300132845,35
	P 20	-				
		150080000,000	99347303,850	,873	-501879512,01	201719512,01
		0				
	O 20	-				
		275000000,000	99347303,850	,213	-626799512,01	76799512,01
		0				
	B 200	-10140000,000	99347303,850	1,000	-361939512,01	341659512,01
	P 200	-				
		375500000,000	99347303,850	,031	-727299512,01	-23700487,99
		0*				
	O 200	-				
	280160000,000	99347303,850	,195	-631959512,01	71639512,01	
	0					

	B 2000	- 260340000,00 0	99347303,850	,270	-612139512,01	91459512,01
	P 2000	- 556020000,00 0*	99347303,850	,001	-907819512,01	-204220487,99
	O 2000	- 691420000,00 0*	99347303,850	,000	- 1043219512,01	-339620487,99
P 20	blanco	98413333,333	99347303,850	,990	-253386178,68	450212845,35
	B 20	150080000,00 0	99347303,850	,873	-201719512,01	501879512,01
	O 20	- 124920000,00 0	99347303,850	,952	-476719512,01	226879512,01
	B 200	139940000,00 0	99347303,850	,911	-211859512,01	491739512,01
	P 200	- 225420000,00 0	99347303,850	,447	-577219512,01	126379512,01
	O 200	- 130080000,00 0	99347303,850	,940	-481879512,01	221719512,01
	B 2000	- 110260000,00 0	99347303,850	,978	-462059512,01	241539512,01
	P 2000	- 405940000,00 0*	99347303,850	,016	-757739512,01	-54140487,99
	O 2000	- 541340000,00 0*	99347303,850	,001	-893139512,01	-189540487,99
O 20	blanco	223333333,33 3	99347303,850	,459	-128466178,68	575132845,35
	B 20	275000000,00 0	99347303,850	,213	-76799512,01	626799512,01
	P 20	124920000,00 0	99347303,850	,952	-226879512,01	476719512,01
	B 200	264860000,00 0	99347303,850	,251	-86939512,01	616659512,01

	P 200	-				
		100500000,00	99347303,850	,988	-452299512,01	251299512,01
		0				
	O 200	-5160000,000	99347303,850	1,000	-356959512,01	346639512,01
	B 2000	14660000,000	99347303,850	1,000	-337139512,01	366459512,01
	P 2000	-				
		281020000,00	99347303,850	,192	-632819512,01	70779512,01
		0				
	O 2000	-				
		416420000,00	99347303,850	,013	-768219512,01	-64620487,99
		0*				
B 200	blanco	-41526666,667	99347303,850	1,000	-393326178,68	310272845,35
	B 20	10140000,000	99347303,850	1,000	-341659512,01	361939512,01
	P 20	-				
		139940000,00	99347303,850	,911	-491739512,01	211859512,01
		0				
	O 20	-				
		264860000,00	99347303,850	,251	-616659512,01	86939512,01
		0				
	P 200	-				
		365360000,00	99347303,850	,038	-717159512,01	-13560487,99
		0*				
	O 200	-				
		270020000,00	99347303,850	,231	-621819512,01	81779512,01
		0				
	B 2000	-				
		250200000,00	99347303,850	,316	-601999512,01	101599512,01
		0				
	P 2000	-				
		545880000,00	99347303,850	,001	-897679512,01	-194080487,99
		0*				
	O 2000	-				
		681280000,00	99347303,850	,000	-	-329480487,99
		0*			1033079512,01	
P 200	blanco	323833333,33	99347303,850	,087	-27966178,68	675632845,35
		3				
	B 20	375500000,00	99347303,850	,031	23700487,99	727299512,01
		0*				
	P 20	225420000,00	99347303,850	,447	-126379512,01	577219512,01
		0				
	O 20	100500000,00	99347303,850	,988	-251299512,01	452299512,01
		0				

	B 200	365360000,00 0*	99347303,850	,038	13560487,99	717159512,01
	O 200	95340000,000	99347303,850	,992	-256459512,01	447139512,01
	B 2000	115160000,00 0	99347303,850	,971	-236639512,01	466959512,01
	P 2000	- 180520000,00 0	99347303,850	,718	-532319512,01	171279512,01
	O 2000	- 315920000,00 0	99347303,850	,102	-667719512,01	35879512,01
O 200	blanco	228493333,33 3	99347303,850	,429	-123306178,68	580292845,35
	B 20	280160000,00 0	99347303,850	,195	-71639512,01	631959512,01
	P 20	130080000,00 0	99347303,850	,940	-221719512,01	481879512,01
	O 20	5160000,000	99347303,850	1,000	-346639512,01	356959512,01
	B 200	270020000,00 0	99347303,850	,231	-81779512,01	621819512,01
	P 200	-95340000,000	99347303,850	,992	-447139512,01	256459512,01
	B 2000	19820000,000	99347303,850	1,000	-331979512,01	371619512,01
	P 2000	- 275860000,00 0	99347303,850	,210	-627659512,01	75939512,01
	O 2000	- 411260000,00 0*	99347303,850	,014	-763059512,01	-59460487,99
B 2000	blanco	208673333,33 3	99347303,850	,547	-143126178,68	560472845,35
	B 20	260340000,00 0	99347303,850	,270	-91459512,01	612139512,01
	P 20	110260000,00 0	99347303,850	,978	-241539512,01	462059512,01
	O 20	-14660000,000	99347303,850	1,000	-366459512,01	337139512,01
	B 200	250200000,00 0	99347303,850	,316	-101599512,01	601999512,01
	P 200	- 115160000,00 0	99347303,850	,971	-466959512,01	236639512,01
	O 200	-19820000,000	99347303,850	1,000	-371619512,01	331979512,01

P 2000	-					
	295680000,00	99347303,850	,148	-647479512,01	56119512,01	
O 2000	0					
	431080000,00	99347303,850	,009	-782879512,01	-79280487,99	
	0*					
P 2000	blanco	504353333,33	99347303,850	,002	152553821,32	856152845,35
		3*				
B 20	556020000,00	99347303,850	,001	204220487,99	907819512,01	
	0*					
P 20	405940000,00	99347303,850	,016	54140487,99	757739512,01	
	0*					
O 20	281020000,00	99347303,850	,192	-70779512,01	632819512,01	
	0					
B 200	545880000,00	99347303,850	,001	194080487,99	897679512,01	
	0*					
P 200	180520000,00	99347303,850	,718	-171279512,01	532319512,01	
	0					
O 200	275860000,00	99347303,850	,210	-75939512,01	627659512,01	
	0					
B 2000	295680000,00	99347303,850	,148	-56119512,01	647479512,01	
	0					
O 2000	-					
	135400000,00	99347303,850	,925	-487199512,01	216399512,01	
	0					
O 2000	blanco	639753333,33	99347303,850	,000	287953821,32	991552845,35
		3*				
B 20	691420000,00	99347303,850	,000	339620487,99	1043219512,0	
	0*				1	
P 20	541340000,00	99347303,850	,001	189540487,99	893139512,01	
	0*					
O 20	416420000,00	99347303,850	,013	64620487,99	768219512,01	
	0*					
B 200	681280000,00	99347303,850	,000	329480487,99	1033079512,0	
	0*				1	
P 200	315920000,00	99347303,850	,102	-35879512,01	667719512,01	
	0					
O 200	411260000,00	99347303,850	,014	59460487,99	763059512,01	
	0*					
B 2000	431080000,00	99347303,850	,009	79280487,99	782879512,01	
	0*					

P 2000	135400000,00 0	99347303,850	,925	-216399512,01	487199512,01
--------	-------------------	--------------	------	---------------	--------------

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

Subconjuntos homogéneos

### UFC

HSD Tukey<sup>a</sup>

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
B 20	3	710000000,00			
B 200	3	720140000,00			
blanco	3	761666666,67	761666666,67		
P 20	3	860080000,00	860080000,00		
B 2000	3	970340000,00	970340000,00	970340000,00	
O 20	3	985000000,00	985000000,00	985000000,00	
O 200	3	990160000,00	990160000,00	990160000,00	
P 200	3		1085500000,0	1085500000,0	1085500000,0
P 2000	3		0	0	0
O 2000	3			1266020000,0	1266020000,0
				0	0
					1401420000,0
					0
Sig.		,195	,087	,148	,102

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

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

### ANEXO B: Análisis estadístico del ensayo de genotoxicidad

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE GENOTÓXICIDAD IN VITRO MEDIANTE EL PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS STATICS

### Comparaciones múltiples

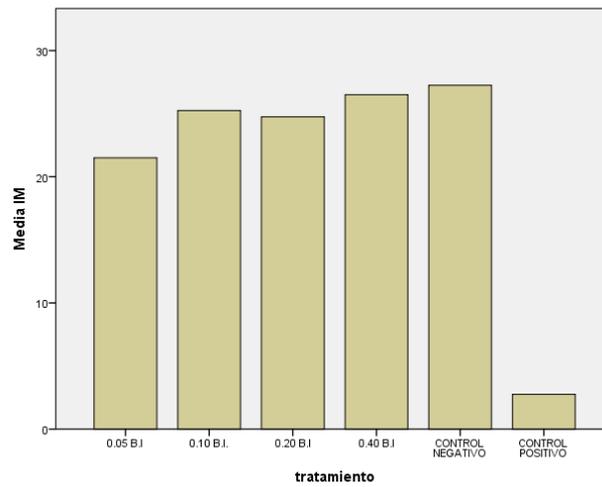
Variable dependiente: IM

HSD Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	0.10 B.I.	-3,750	3,648	,902	-15,34	7,84

0.05 B.I	0.20 B.I	-3,250	3,648	,944	-14,84	8,34
	0.40 B.I	-5,000	3,648	,743	-16,59	6,59
	CONTROL NEGATIVO	-5,750	3,648	,623	-17,34	5,84
	CONTROL POSITIVO	18,750*	3,648	,001	7,16	30,34
0.10 B.I.	0.05 B.I	3,750	3,648	,902	-7,84	15,34
	0.20 B.I	,500	3,648	1,000	-11,09	12,09
	0.40 B.I	-1,250	3,648	,999	-12,84	10,34
	CONTROL NEGATIVO	-2,000	3,648	,993	-13,59	9,59
	CONTROL POSITIVO	22,500*	3,648	,000	10,91	34,09
0.20 B.I	0.05 B.I	3,250	3,648	,944	-8,34	14,84
	0.10 B.I.	-,500	3,648	1,000	-12,09	11,09
	0.40 B.I	-1,750	3,648	,996	-13,34	9,84
	CONTROL NEGATIVO	-2,500	3,648	,981	-14,09	9,09
	CONTROL POSITIVO	22,000*	3,648	,000	10,41	33,59
0.40 B.I	0.05 B.I	5,000	3,648	,743	-6,59	16,59
	0.10 B.I.	1,250	3,648	,999	-10,34	12,84
	0.20 B.I	1,750	3,648	,996	-9,84	13,34
	CONTROL NEGATIVO	-,750	3,648	1,000	-12,34	10,84
	CONTROL POSITIVO	23,750*	3,648	,000	12,16	35,34
CON TRO L NEG ATIV O	0.05 B.I	5,750	3,648	,623	-5,84	17,34
	0.10 B.I.	2,000	3,648	,993	-9,59	13,59
	0.20 B.I	2,500	3,648	,981	-9,09	14,09
	0.40 B.I	,750	3,648	1,000	-10,84	12,34
	CONTROL POSITIVO	24,500*	3,648	,000	12,91	36,09
CON TRO L POSI TIVO	0.05 B.I	-18,750*	3,648	,001	-30,34	-7,16
	0.10 B.I.	-22,500*	3,648	,000	-34,09	-10,91
	0.20 B.I	-22,000*	3,648	,000	-33,59	-10,41
	0.40 B.I	-23,750*	3,648	,000	-35,34	-12,16
	CONTROL NEGATIVO	-24,500*	3,648	,000	-36,09	-12,91

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



## MICRONÚCLEOS

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		MCN
N		24
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	,42
	Desviación estándar	,830
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,442
	Positivo	,442
	Negativo	-,308
Estadístico de prueba		,442
Sig. asintótica (bilateral)		,000 <sup>c</sup>

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

### Tabla cruzada MCN\*tratamiento

Recuento

		Tratamiento						Total
		0.05 B.I.	0.10 B.I.	0.20 B.I.	0.40 B.I.	CONTROL NEGATIVO	CONTROL POSITIVO	
MCN	NULO	4	3	4	4	2	1	18
	BAJO	0	1	0	0	2	0	3
	MEDIO	0	0	0	0	0	2	2
	ALTO	0	0	0	0	0	1	1
Total		4	4	4	4	4	4	24

ANEXO C: evidencias fotográficas del trabajo del trabajo de investigación



Secado del material vegetal



Control de calidad de la droga  
cruda



Tamizaje fitoquímico



Estandarización del extracto



Concentración del extracto en  
rotavapor



Liofilización del extracto



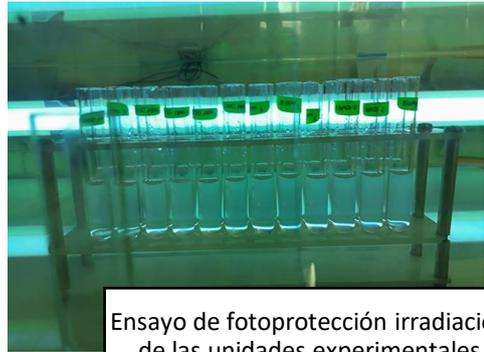
Determinación de flavonoides



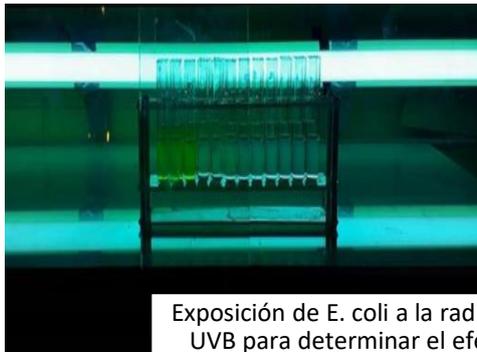
Determinación de la actividad  
antioxidante



preparación de las muestras para el ensayo de irradiación



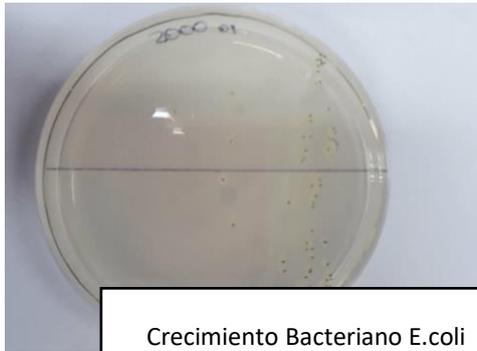
Ensayo de fotoprotección irradiación de las unidades experimentales



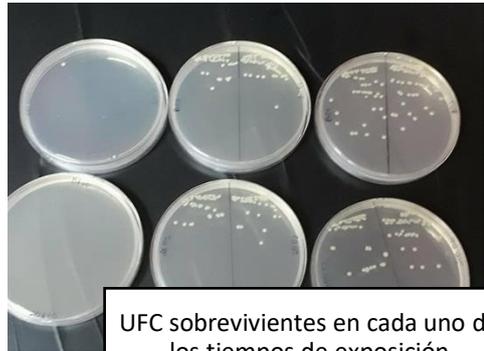
Exposición de E. coli a la radiación UVB para determinar el efecto fotoprotector



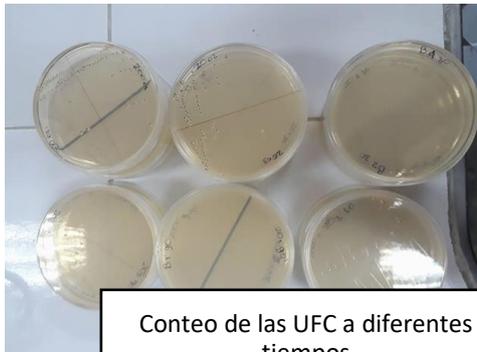
Lámpara UVB utilizada en el ensayo de fotoprotección



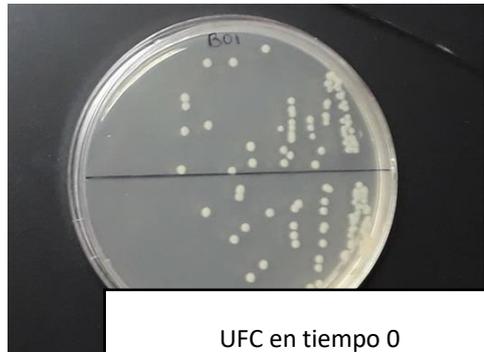
Crecimiento Bacteriano E.coli



UFC sobrevivientes en cada uno de los tiempos de exposición



Conteo de las UFC a diferentes tiempos



UFC en tiempo 0



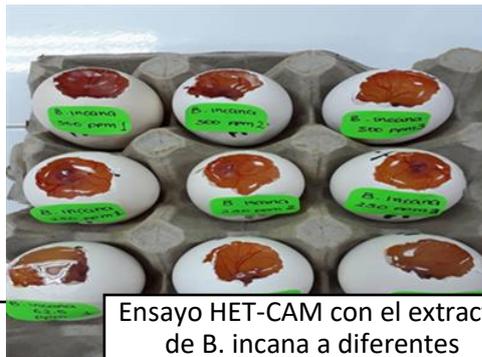
Ensayo de irritabilidad ocular *in vitro* HET-CAM



Control positivo test HET-CAM



Controles positivos y negativos HET-CAM



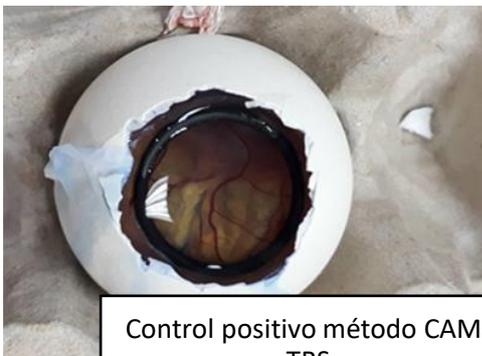
Ensayo HET-CAM con el extracto de *B. incana* a diferentes concentraciones



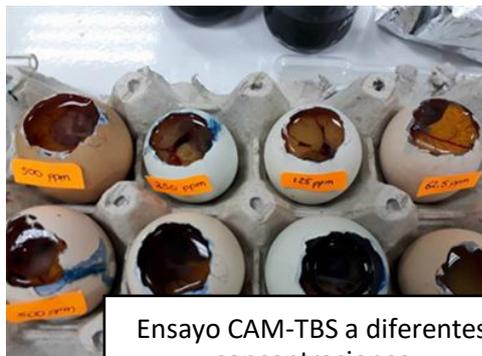
Irritabilidad ocular *in vitro* método CAM-TBS



Determinación de la irritabilidad ocular *in vitro* usando azul tripán



Control positivo método CAM-TBS



Ensayo CAM-TBS a diferentes concentraciones



Ensayo de genotoxicidad test de micronúcleos



Raíces expuestas a los extractos de *B. incana*



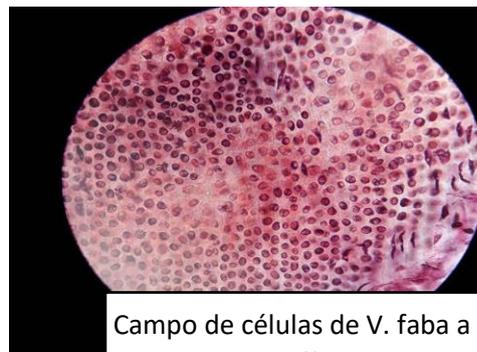
Raíces de *V. faba* variedad minor



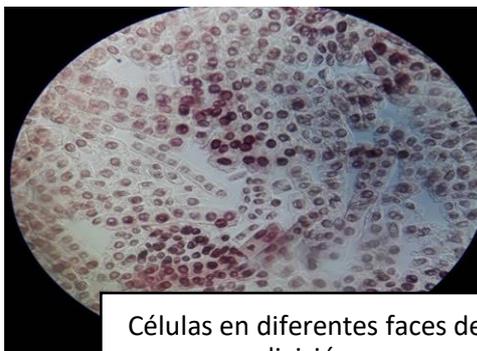
Hidrólisis de las raíces



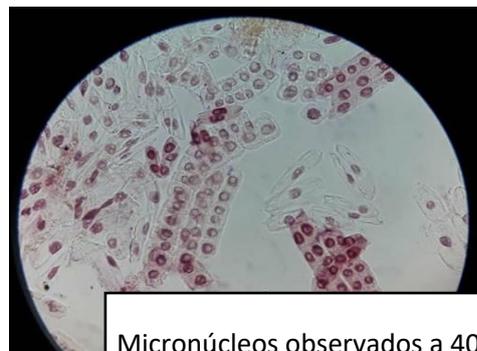
Tinción de las muestras con azul Tripán



Campo de células de *V. faba* a 40 X



Células en diferentes fases de división



Micronúcleos observados a 40 X