



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

“EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R.Br. Y *Passiflora manicata* (Juss.) Pers., PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN PROTECTORES SOLARES.”

#### **TRABAJO DE TITULACIÓN**

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

#### **BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:** BRYAN MARCELO HIDALGO ALVEAR

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

Riobamba-Ecuador

2019

**© 2019, Bryan Marcelo Hidalgo Alvear**

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 de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo trabajo experimental “**EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R.Br. Y *Passiflora manicata* (Juss.) Pers., PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN PROTECTORES SOLARES.**”, de responsabilidad del señor Bryan Marcelo Hidalgo Alvear, ha sido prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación.

**Tribunal:**

**FIRMA**

**FECHA**

BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACION**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Gisela Pilco Bonilla, M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Bryan Marcelo Hidalgo Alvear soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

---

Bryan Marcelo Hidalgo Alvear

060502801-8

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de Titulación va dedicado a mis padres, hermana, abuelita paterna, abuelitos y tíos maternos que aportaron con su apoyo incondicional en todo momento para poder llegar a culminar mi carrera universitaria.

Bryan

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por iluminar mi mente y mi camino cuando me sentía abatido por los problemas, por ser un apoyo de fe omnipresente en toda mi vida y sobre todo en los años universitarios. A mis padres Marcelo y Marianela por toda la dedicación y recursos invertidos todo este tiempo, por los valores que me inculcaron para ser una persona de bien, por los consejos que permitieron aclarar mi camino y no rendirme, por su amor, fortaleza y comprensión incondicional.

A mi abuelita Mariana por su esfuerzo diario durante mi carrera universitaria, que fue un soporte esencial para no decaer y seguir avanzando cada semestre, por su amor, paciencia, dedicación y por siempre tratar de hacerme compañía. A mi hermana Jomara por cumplir el rol de amiga, consejera y confidente a la vez, por no juzgarme y siempre escuchar con atención mis éxitos y fracasos.

A mis abuelitos Gerardo y Elvia por inculcarme gran parte de todo lo bueno de mí. A mis tíos Elenita, Huguito, Anita y José por sus ánimos y consejos en mis primeros años de la universidad cuando no estaba seguro del trayecto que había elegido. También a mis primos por darme vitalidad con sus juegos cuando estaba agotado.

Agradezco a mi novia Sole, por su amor incondicional todos estos años, por ser la luz de mis ojos cuando estoy perdido, por su carisma, por hacerme reír todos los días, por escucharme, por sus enseñanzas que permitieron que sea una mejor persona, por siempre decirme que no existe el hubiera.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser mi alma mater y la cuna para forjar mis conocimientos. También quiero agradecer a mi tutor Diego Vinueza, por sus enseñanzas, por su paciencia, por su energía, amor y sabiduría para explicar las cosas que fue el aliciente desde los primeros semestres para crecer intelectualmente. A mis mejores amigos, José Rivera y Daniel Naranjo por su fidelidad, su apoyo y compañía. A Manuelita Daquilema, Gualberto Naranjo, Patricia Vásquez y Guillermo Aguilera por acogerme en su casa cuando más lo necesitaba.

A mi maestra de primaria Erminia Jaramillo por sus valiosas enseñanzas y la fe impuesta en mí, que a la final se convirtió en el motor para llegar hasta aquí, y también a mi maestro de inglés Luis Guadalupe por creer en mí y nunca desmotivarme cuando tenía algún fracaso.

Bryan Marcelo Hidalgo Alvear

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**CAM** Membrana corioalantoidea

**CAM-TBS** Test de membrana corioalantoidea en huevo de gallina con azul Tripán

**EAG** Equivalentes de ácido gálico

**EQ** Equivalentes de quercetina

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

**kg** Kilogramos

**K-S** Test de Kolmogorov-Smirnov

**m** Moles

**mg** Miligramos

**mL** Mililitros

**μL** Microlitros

**MAE** Ministerio del ambiente

**MCNs** Micronúcleos

**nmoles** Nanomoles

***O. grandiflora*** *Oreocallis grandiflora*

**OMS** Organización Mundial De La Salud

***P. manicata*** *Passiflora manicata*

**ppm** Partes por millón

**OPS** Organización Panamericana De La Salud

**R<sup>2</sup>** Coeficiente de correlación

**UV-B** Radiación ultravioleta B

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE GRÁFICOS	xv
ÍNDICE DE ANEXOS	xvi
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xviii
INTRODUCCIÓN	1

### CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO	4
1.1.	Antecedentes de la investigación	4
1.2.	La biodiversidad en el Ecuador	6
1.3.	Uso de plantas medicinales en el Ecuador	7
1.4.	<i>Oreocallis grandiflora</i>	7
1.4.1	<i>Descripción</i>	7
1.4.2	<i>Hábitat</i>	8
1.4.3	<i>Usos etnobotánicos</i>	9
1.4.4	<i>Estudios de sus actividades biológicas.</i>	9
1.5.	<i>Passiflora manicata</i>	10
1.5.1	<i>Descripción</i>	10
1.5.2	<i>Hábitat</i>	11



1.5.3	<i>Usos etnobotánicos</i>	12
1.5.4	<i>Estudios de sus actividades biológicas</i>	12
1.6.	<b>Los flavonoides</b>	13
1.6.1	<i>Toxicidad de flavonoides</i>	13
1.7.	<b>Ensayos <i>in vivo</i> de irritación ocular y genotoxicidad.</b>	15
1.7.1	<i>Ensayos in vivo</i>	15
1.7.2	<i>Prueba de Draize</i>	15
1.7.3	<i>Prueba de Genotoxicidad sobre células de médula ósea de ratones</i>	16
1.8.	<b>Ensayos <i>in vitro</i> de irritación ocular y genotoxicidad.</b>	16
1.8.1	<i>Ensayos in vitro</i>	16
1.8.2	<i>Ensayo de la irritación ocular por el método HET-CAM.</i>	16
1.8.3	<i>Ensayo de la irritación ocular por el método CAM-TBS.</i>	17
1.8.4	<i>Evaluación de la genotoxicidad mediante el test de micronúcleos en Vicia faba.</i>	18
1.8.5	<i>Test de Ames</i>	19

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b>	20
2.1.	<b>Lugar de la investigación</b>	20
2.2.	<b>Recolección del material vegetal</b>	20
2.3.	<b>Identificación del material vegetal</b>	20
2.4.	<b>Preparación de la materia vegetal</b>	20
2.5.	<b>Control de calidad del material vegetal</b>	21
2.5.1	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	21
2.5.2	<i>Determinación de cenizas totales</i>	22
2.5.3	<i>Determinación de cenizas solubles en H<sub>2</sub>O</i>	22
2.5.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en HCl</i>	23

2.6.	Tamizaje fitoquímico _____	24
2.7.	Obtención y estandarización del extracto de <i>P. manicata</i> y <i>O. grandiflora</i> .__	26
2.8.	Determinación de fenoles totales _____	26
2.9.	Determinación de flavonoides totales _____	27
2.10.	Determinación de la irritación ocular por el método HET-CAM. _____	28
2.11.	Determinación de la irritación ocular por el método CAM-TBS. _____	28
2.12.	Determinación de la genotoxicidad en <i>Vicia faba</i> var. minor. _____	29
2.13.	Análisis estadístico del test de MCNs en <i>vicia faba</i> . _____	31

### CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN _____	32
3.1.	Control de calidad de la droga cruda _____	32
3.1.1	<i>Contenido de humedad</i> _____	33
3.1.2	<i>Contenido de cenizas totales</i> _____	33
3.1.3	<i>Contenido de cenizas solubles en H<sub>2</sub>O y cenizas insolubles en HCl</i> _____	34
3.2.	Tamizaje fitoquímico _____	34
3.2.1	<i>Extracto etéreo</i> _____	35
3.2.2	<i>Extracto alcohólico</i> _____	36
3.2.3	<i>Extracto acuoso</i> _____	37
3.3.	Estandarización del extracto de <i>P. manicata</i> y <i>O. grandiflora</i> . _____	38
3.4.	Determinación de fenoles totales _____	39
3.5.	Determinación de flavonoides totales _____	41
3.6.	Determinación de la irritación ocular por el método <i>in vitro</i> HET-CAM. ____	44
3.7.	Determinación de la irritación ocular por el método CAM-TBS. _____	45
3.8.	Determinación de la genotoxicidad en <i>Vicia faba</i> a través del test de MCNs	47

<b>3.7.1</b>	<b><i>Análisis estadístico de la genotoxicidad mediante el test de MCNs en Vicia faba</i></b>	<b>49</b>
3.7.1.1	<i>Índice mitótico</i>	49
3.7.1.2	<i>Índice de micronúcleos</i>	52
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>55</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Distribución regional de la flora ecuatoriana. _____	6
Tabla 2-1: Clasificación taxonómica de <i>Oreocallis grandiflora</i> . _____	8
Tabla 3-1: División taxonómica de <i>Passiflora manicata</i> . _____	11
<b>Tabla 1-3:</b> Resultados del control de calidad de <i>Passiflora manicata</i> . _____	32
<b>Tabla 2-3:</b> Resultados del control de calidad de <i>Oreocallis grandiflora</i> . _____	32
<b>Tabla 3-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de las hojas de <i>P. manicata</i> . _____	35
<b>Tabla 4-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de las hojas de <i>O. grandiflora</i> . _____	35
<b>Tabla 5-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas de <i>P. manicata</i> . _____	36
<b>Tabla 6-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas de <i>O. grandiflora</i> . _____	36
<b>Tabla 7-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de <i>P. manicata</i> . _____	37
<b>Tabla 8-3:</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de <i>O. grandiflora</i> . _____	37
<b>Tabla 9-3:</b> Resultados del rendimiento y análisis organoléptico del extracto de <i>P. manicata</i> . _____	38
<b>Tabla 10-3:</b> Resultados del rendimiento y análisis organoléptico del extracto de <i>O. grandiflora</i> . _____	38
<b>Tabla 11-3:</b> Resultados de las absorbancias del estándar de ácido gálico. _____	40
<b>Tabla 12-3:</b> Resultados del contenido de fenoles totales del extracto seco de <i>P. manicata</i> . _____	40
<b>Tabla 13-3:</b> Resultados del contenido de fenoles totales del extracto seco de <i>O. grandiflora</i> . _____	41
<b>Tabla 14-3:</b> Resultados de las absorbancias del estándar de quercetina _____	42
<b>Tabla 15-3:</b> Resultados del contenido de flavonoides totales del extracto seco de <i>P. manicata</i> . _____	42
<b>Tabla 16-3:</b> Resultados del contenido de flavonoides totales del extracto seco de <i>O. grandiflora</i> . _____	43
<b>Tabla 17-3:</b> Resultados del test HET-CAM de <i>Passiflora manicata</i> . _____	44
<b>Tabla 18-3:</b> Resultados del test HET-CAM de <i>Oreocallis grandiflora</i> . _____	44

<b>Tabla 19-3:</b> Resultados de las absorbancias del colorante azul tripán. _____	45
<b>Tabla 20-3:</b> Resultados del test CAM-TBS de <i>Passiflora manicata</i> . _____	46
<b>Tabla 21-3:</b> Resultados del test CAM-TBS de <i>Oreocallis grandiflora</i> _____	46
<b>Tabla 22-3:</b> Resultados del test de micronúcleos de <i>Passiflora manicata</i> . _____	47
<b>Tabla 23-3:</b> Resultados del test de micronúcleos de <i>Oreocallis grandiflora</i> . _____	47
<b>Tabla 24-3:</b> Test de normalidad de Shapiro Wilk para <i>P. manicata</i> . _____	49
<b>Tabla 25-3:</b> Test de normalidad de Shapiro Wilk para <i>O. grandiflora</i> . _____	50
<b>Tabla 26-3:</b> Estadístico de Levene de <i>P. manicata</i> . _____	50
<b>Tabla 27-3:</b> Estadístico de Levene de <i>O. grandiflora</i> . _____	50
<b>Tabla 28-1:</b> Test de ANOVA de un factor para <i>P. manicata</i> . _____	50
<b>Tabla 29-3:</b> Test de ANOVA de un factor para <i>O. grandiflora</i> . _____	51
<b>Tabla 30-3:</b> Test de Tukey de <i>P. manicata</i> . _____	51
<b>Tabla 31-3:</b> Test de Tukey de <i>O. grandiflora</i> . _____	52
<b>Tabla 32-3:</b> Test de normalidad de K-S para el índice de MCNs de <i>P. manicata</i> y <i>O. grandiflora</i> . _____	52
<b>Tabla 33-3:</b> Test de Chi-Cuadrado para para el Índice de MCNs de <i>P. manicata</i> y <i>O. grandiflora</i> . _____	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> <i>Oreocallis grandiflora</i> . _____	8
<b>Figura 2-1:</b> <i>Passiflora manicata</i> . _____	11
<b>Figura 3-1:</b> Estructura básica de los flavonoides. _____	13
<b>Figura 4-1:</b> Estructura de la quercetina, rutina y canferol. _____	14
<b>Figura 5-1:</b> Estructura de la quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido. _____	14
<b>Figura 6-1:</b> Conejos de laboratorio listos para realizarse el test de Draize. _____	15
<b>Figura 7-1:</b> Membrana corioalantoidea de huevo de gallina. _____	17
<b>Figura 8-1:</b> Semillas de <i>Vicia faba</i> var. minor. _____	18
<b>Figura 9-1:</b> Formación de micronúcleos. _____	19

## INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Curva de calibración de las absorbancias del estándar de ácido gálico. _____	40
<b>Gráfico 2-3:</b> Curva de calibración de las absorbancias del estándar de quercetina. _____	42
<b>Gráfico 3-3:</b> Curva de calibración del colorante azul tripán en dimetil formamida. _____	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A** : Evidencias fotográficas de la realización del trabajo de titulación.

**Anexo B** : contrato de acceso a recursos genéticos suscrito entre la ESPOCH y el Ministerio del Ambiente del Ecuador MAE-DNB-CM-2018-0086.



## RESUMEN

El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo evaluar la seguridad *in vitro* de los extractos de *Oreocallis grandiflora* y *Passiflora manicata* para su potencial aplicación en protectores solares. Se realizó el control de calidad de la droga vegetal mediante métodos gravimétricos. Se efectuó el tamizaje fitoquímico para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios. Se determinó los fenoles y flavonoides totales mediante los métodos de Folin-Ciocalteu y complejación con  $AlCl_3$ . El potencial irritante de los extractos se evaluó mediante el test de la membrana corioalantoidea de huevo de gallina (HET-CAM), donde se evaluó los signos de la inflamación. También se utilizó la prueba de tinción con azul tripan de la membrana corioalantoidea (CAM-TBS), para determinar la cantidad de colorante absorbido por dicha membrana. Para determinar el potencial genotóxico se empleó el test de micronúcleos en *Vicia faba*, donde se evaluó el índice mitótico e índice de micronúcleos. Los resultados mostraron una calidad óptima de la droga vegetal. El contenido de fenoles totales fue de  $240 \pm 10$  y  $208.33 \pm 12.58$  mg EAG/g extracto, y de flavonoides totales de  $259.68 \pm 3.97$  y  $286.29 \pm 7.39$  EQ/g extracto, en *P. manicata* y *O. grandiflora* respectivamente. En el test HET-CAM al no evidenciar ningún signo de inflamación, los extractos de las dos especies se clasificaron como no irritantes. En el ensayo CAM-TBS también se les clasificó como no irritantes, ya que la cantidad de azul tripan absorbido no superaba los 0.1 nmoles/mg. En el ensayo de genotoxicidad no causaron inhibición de la mitosis ni presencia de micronúcleos. Se concluye que los extractos de *P. manicata* y *O. grandiflora* no son genotóxicos, ni tampoco causan irritación en la piel, por lo que son seguros para ser aplicados en protectores solares. Se recomienda realizar pruebas complementarias de irritación como el test de glóbulos rojos (RBC) para reforzar los resultados obtenidos.

**PALABRAS CLAVE:** <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOQUÍMICA>, <TAXO (*Passiflora manicata*)>, <CUCHARILLA (*Oreocallis grandiflora*)>, <IRRITACIÓN OCULAR>, <GENOTOXICIDAD>, <MICRONÚCLEOS>, <ÍNDICE MITÓTICO>.

## SUMMARY

The current research was aimed to assess the *in vitro* safety of *Oreocallis grandiflora* and *Passiflora manicata* extracts for their potential application in sunscreens. The quality control of the plant drug was carried out by applying gravimetric methods. Phytochemical screening was carried out for qualitative determination of the presence of secondary metabolites. Total phenols and flavonoids were determined by Folin-Ciocalteu methods and complexation with AlCl<sub>3</sub>. The irritant potential of extracts was evaluated by means of the chorioallantoic membrane test of the chicken egg (HET-CAM), where the signs of inflammation were assessed. The trypan blue stain test of the chorioallantoic membrane (CAM-TBS) was also used in order to determine the amount of dye absorbed by the membrane. In order to determine the genotoxic potential, the micronucleus test was used in *Vicia faba*, where the mitotic index and micronucleus index were evaluated. The results showed an optimal quality of the plant drug. The content of total phenols was 240±10 and 208.33±12.58 mg EAG/g extract and total flavonoids of 259.68±3.97 and 286.29±7.39 EQ/g extract, in *P. manicata* and *O. grandiflora* respectively. In the HET-CAM test, there was no evidence of inflammation, so the extracts of the two species were classified as non-irritant. They were also classified as non-irritant in the CAM-TBS trial due to the amount of trypan blue absorbed did not exceed the 0.1 nmol/mg. In the genotoxicity trial, they did not cause inhibition of mitosis or the presence of micronucleus. It is concluded that the extracts *P. manicata* and *O. grandiflora* are not genotoxic, and also they do not cause skin irritation, so they are safe to be applied in sunscreens. It is recommended to carry out complementary tests of irritation such as the red blood cell (RBC) test to reinforce the results obtained.

**KEYWORDS:** <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY>, <TAXO (*Passiflora manicata*)>, <CUCHARILLA (*Oreocallis grandiflora*)>, <EYE IRRITATION>, <GENOTOXICITY>, <MICRONUCLEUS>, <MITOTIC INDEX>.

## INTRODUCCIÓN

Existen aproximadamente 33000 especies vegetales en el mundo de las cuales 3200 se encuentran en el Ecuador y son utilizadas por las personas de las zonas rurales y en menor proporción por aquellas de las zonas urbanas como tratamiento para ciertas patologías, ya sea por la dificultad de acceso a los centros de salud o falta de recursos para conseguir medicamentos (Sponchiado *et al.*, 2016, pp.2-4).

Se estima que el 80 % de la población ecuatoriana emplea la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria. Sin embargo, no están conscientes del efecto que podría causar, ya que estos saberes ancestrales que han sido transmitidos de manera oral de padres a hijos se han perdido, debido principalmente a la globalización y a la comercialización de fármacos sintéticos (Ansaloni *et al.*, 2010, p.1).

Las plantas contienen metabolitos que podrían poseer diferentes actividades biológicas en los seres humanos, e incluso actuar como defensa frente a insectos y animales. Actualmente, existe desconocimiento sobre cómo emplear algunas especies vegetales, sus principios tóxicos y la dosificación requerida para lograr los efectos terapéuticos (Sponchiado *et al.*, 2016, pp.2-4)

Este fenómeno se produce porque se ha tenido una visión equivocada de la seguridad de las plantas medicinales, sin tomar en consideración que lo natural no es sinónimo de inocuo. El uso de fitofármacos conforma una nueva opción terapéutica, con un marcado auge en el siglo XXI. La presencia de plantas en el Ecuador con potencial terapéutico permite desarrollar este tipo de medicamentos como una forma de tratamiento alternativo que contribuye a mejorar la salud de la población.

No obstante, la toxicidad de las plantas que se emplean en fitomedicamentos no ha sido evaluada por completo, pudiendo llegar a causar efectos adversos en la salud humana; de ahí la necesidad de realizar ensayos para determinar la seguridad de sus componentes antes de ser incluidos en las formulaciones, para garantizar un tratamiento seguro y eficaz para el paciente (Bermúdez *et al.*, 2007; Sponchiado *et al.*, 2016).

Entre los ensayos que se emplean para evaluar la seguridad de los extractos de las plantas se encuentran los de actividad genotóxica e irritación ocular. Éstas pruebas pueden ser *in vitro* e *in vivo*, sin embargo dentro de estas últimas se encuentra el test de Draize, cuyo empleo ha sido fuertemente criticado desde su implementación en los años cuarenta, ya que sus resultados en relación a la capacidad de inflamación o irritación ocular de una sustancia se basan en las consecuencias que producen en los globos oculares de los conejos; de modo que el enfoque

actual es el de sustituir esta prueba, tanto por aspectos bioéticos como por la variabilidad y subjetividad de sus resultados (Silbergeld, 2000, p.54).

Esta investigación contribuye a determinar la seguridad de los extractos de *Oreocallis grandiflora* y *Passiflora manicata* que serán utilizados en la elaboración de fitofármacos de aplicación tópica. Esto se realizó a través de los ensayos de la actividad genotóxica, para determinar la capacidad que tienen los extractos para dañar el ADN y los de irritación ocular, para predecir los efectos tóxicos sobre las membranas mucosas y la piel (Sponchiado *et al.*, 2016, pp.1-2).

El estudio desarrollado representa un cambio en la manera convencional de determinar el potencial de irritación ocular y genotoxicidad, ya que se evita el uso de animales. En la actualidad, se considera con mayor relevancia que otras épocas, los aspectos éticos estrechamente relacionados con el actuar del individuo; pudiendo destacar de ésta manera, que la investigación en beneficio del hombre es posible, sin dañar o alterar su entorno. Y obteniendo resultados extrapolables con métodos *in vivo*, además de instaurar las tres R (Reducir, Refinar y Reemplazar) descritas por Rex Burch y Bill Rusell (Bermúdez, 2007; Sponchiado, 2016 ).

Para alcanzar este objetivo se empleó el ensayo HET-CAM como una alternativa confiable frente al método de Draize, y el ensayo HET CAM-TBS para obtener resultados cuantitativos de la capacidad irritativa de los extractos; por último, la prueba de Genotoxicidad en *Vicia faba* para evaluar la frecuencia de micronúcleos y el índice mitótico (Reis Mansur *et al.*, 2016, p.4).

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la seguridad *in vitro* de los extractos de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R.Br. y *Passiflora manicata* (Juss.)Pers., para su potencial aplicación en protectores solares.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar la posible genotoxicidad de los extractos hidroalcohólicos de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R.Br. y *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. mediante el ensayo de micronúcleos en *Vicia faba*.
- Determinar el potencial de irritación ocular de los extractos hidroalcohólicos de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R.Br. y *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. en el modelo de membrana corioalantoidea de huevo de gallina (HET-CAM).
- Determinar el potencial de irritación ocular de los extractos hidroalcohólicos de *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R.Br. y *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. en el modelo CAM-TBS (Trypan Blue Staining).

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes de la investigación

Madariaga *et al.*, (2006, pp.5-6), en su investigación denominada “Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método *in vitro* en sustitución de la prueba en conejos” evaluó la irritabilidad ocular de tres cremas cosméticas elaboradas en el laboratorio de Cosméticos ubicado en la de provincia de Villa Clara (Cuba), a través del ensayo HET-CAM como alternativa a la prueba de Draize. Mediante los resultados obtenidos las cremas cosméticas se clasificaron como no irritantes ya que ninguna de ellas causó cambios morfológicos en los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea de los huevos de gallina, avalando así la seguridad de los cosméticos.

En la Universidad de San Martín de Porres en Perú se realizó una investigación titulada “ Efecto irritante *in vitro* de formulaciones con extracto de camu camu, mediante el método HET-CAM para evaluar el potencial irritante de formulaciones cosméticas elaboradas por el laboratorio AYRU COSMETIC, después de realizar los ensayos , se evidenció que los extractos no causan alteración de la membrana corioalantoidea, lo que se verificó a través de índices de irritación mayores a 300 tanto para la crema, gel y loción, y por la ínfima presencia de azul tripán absorbido, con valores de 6.2, 8.3 y 7.4 x 10<sup>-9</sup> para la crema, gel y loción respectivamente. Esto permitió clasificar a los productos cosméticos como no irritantes y avalar su seguridad para posteriormente realizar ensayos de eficacia clínica (Inocente, Toscano y Castañeda, 2013, pp.5-7).

Celestino y Llasca ( 2017, p.77), en su investigación titulada “Evaluación de la irritabilidad ocular *in vitro* mediante el método HET-CAM en cremas para contorno de ojos con y sin registro sanitario que se comercializan en el distrito de la Victoria, la parada -Lima.” se evaluó cremas par el contorno de los ojos, a través del método HET-CAM cualitativo y el HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS). Se evidenció que las cremas con registro sanitario tienen un potencial irritante bajo, por lo que son seguras para ser comercializadas, no obstante las cremas carentes del registro sanitario son altamente irritantes para el contorno de los ojos, evidenciando la falta de calidad y seguridad para las personas que las utilicen.

Un estudio realizado por Khadra *et al.*, (2012, pp.3-5), titulado “Evaluación de la genotoxicidad de suelos contaminados con quinolonas y fluoroquinolonas con la prueba de micronúcleos en *Vicia*

*faba*” cuyo objetivo fue evaluar el potencial genotóxico de la Ciprofloxacina, Enrofloxacina y del Ácido nalidíxico, causantes de contaminación en suelos, se analizaron tanto en forma individual como en mezclas, encontrando que el porcentaje de efecto genotóxico fue de 48.7 %, 44.8 % y 30% para el ácido nalidíxico, Ciprofloxacina y Enrofloxacina respectivamente, y de 92% para la mezcla a una concentración de 20 mg/kg, demostrando así por primera vez la genotoxicidad de las quinolonas y fluoroquinolonas, además se demostró la sensibilidad de la prueba de genotoxicidad por el método de micronúcleos en *Vicia faba*. Esta investigación también recalca que estos antibióticos pueden encontrarse en aguas residuales, por lo que es necesario realizar investigaciones de ecotoxicidad.

El estudio realizado por Yanza (2017, p.71), titulado “Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica del extracto hidroalcohólico de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora*” donde se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* en términos de viabilidad celular, reveló que el extracto de flores tiene un mayor porcentaje de viabilidad celular y por consiguiente menor citotoxicidad, presentando un porcentaje que fluctúa entre 40-86%, a diferencia del extracto de las hojas que presentó un valor entre 21-67%. La mayor concentración de flavonoides totales se encuentra en las hojas de la planta, los cuales están relacionados con la actividad citotóxica.

Bravo (2017, p.68), en su estudio titulado de la “Evaluación toxicológica aguda de los extractos etanólicos de hojas de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* sobre *Rattus norvegicus* por vía oral” expresa que en situaciones experimentales, la administración en ratas de los extractos etanólicos de las hojas de las especies vegetales durante un periodo de 14 días, no presentan toxicidad morfológica, neurológica o fisiológica, tampoco se hallaron diferencias significativas en parámetros hematológicos.

Idrobo (2016, p.76), en su estudio denominado “Evaluación ansiolítica comparativa por solventes de los extractos de hojas flores de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* mediante administración vía oral en ratones *Mus musculus*.” encontró que en el análisis de citotoxicidad realizado en *Artemia salina*, el extracto de flores de *P. tripartita* en metanol es el más seguro para su uso al tener una DL 50 de 675 ppm, mientras que los extracto de hojas de *P. manicata* en acetato de etilo seguido por hojas de *P. tripartita* en agua son los más tóxicos al tener los DL 50 de 75 y 90 ppm respectivamente.

En la investigación realizada por Samaniego (2018, pp.49-51), cuyo título es “Determinación de las actividades fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana*”. Se realizó las mismas pruebas de irritación ocular y genotoxicidad que el presente estudio, encontrando que el extracto de *Buddleja incana* a

diferentes concentraciones no causó irritación ocular en la prueba cualitativa (HET-CAM) ni en la cuantitativa (CAM-TBS), tampoco tuvo actividad genotóxica al no presentar micronúcleos e inhibición mitótica. No obstante, el agua de grifo utilizada como control negativo tuvo cierta genotoxicidad debido a sus metales pesados. Mancheno (2018, pp.50-53), realizó la misma investigación con la especie *Lippia triphylla* y obtuvo resultados similares, los extractos hidroalcohólicos carecen de actividad genotóxica e irritación ocular, una diferencia frente a la investigación anterior es que no obtuvo micronúcleos en el control negativo ya que utilizó agua destilada.

## 1.2. La biodiversidad en el Ecuador

Bravo-Velásquez (2014, pp.53-54), expresa que Ecuador es considerado como un país megadiverso debido a la cantidad de especies que alberga. Con una extensión de 256.370 km<sup>2</sup> que representa el 0.17% de la superficie terrestre del planeta, contiene el 11% de las especies de vertebrados de la tierra; 16.087 clases de plantas vasculares; y aproximadamente 600 de peces. Si se hace una relación con el número de especies vertebradas por unidad de superficie, por cada 1.000 km<sup>2</sup> Ecuador posee 11 especies. La distribución regional de la flora ecuatoriana se puede observar en la siguiente tabla:

**Tabla 1-1:** Distribución regional de la flora ecuatoriana.

Regiones con el mayor número de especies		Provincias con el mayor número de especies	
Región	Número de especies	Provincia	Número de especies
Costa	4463	Esmeraldas	2333
Sierra	9865	Pichincha	4759
Amazonía	4857	Napo	5886
Galápagos	699		

**Fuente:** Bravo-Velásquez, 2014, p.56.

**Realizado por:** Bryan Hidalgo, 2019.

En cuanto a las plantas vasculares, 595 especies son exóticas, subdivididas en 346 cultivadas o empeladas como ornamentales y 249 introducidas accidentalmente. También se han identificado 15.306 plantas nativas, conformadas por 4173 especies endémicas (Bravo-Velásquez, 2014, p.54).



El 4% de las especies endémicas pertenecen al grupo de los helechos. El 36% de plantas endémicas se localizan en la zona andina del país, distribuidas en el valle de Chambo, Cañar, Chanchán, Loja Paute, Patate y Guallabamba. En menor proporción existen también especies endémicas en la Amazonía, Costa y Galápagos (Bravo-Velásquez, 2014, p.57).

### **1.3. Uso de plantas medicinales en el Ecuador**

En la actualidad las plantas medicinales han tomado gran importancia, desde hace milenios los pueblos han utilizado la tierra como su farmacia natural. En el Ecuador cada vez más personas utilizan plantas medicinales para tratar diversas enfermedades. De todas las plantas empleadas como fuentes medicinales, el 45% se encuentra dentro del grupo usadas para combatir síntomas, y el 26% para curar afecciones producidas por virus, bacterias, hongos y parásitos. Entre los grupos étnicos que más plantas medicinales utiliza están los Kichwas de la Amazonía, seguidos por los grupos indígenas de la región Sierra y por último los mestizos (Cerón Martínez, 2006, p.3).

El estudio realizado por Cerón Martínez encontró que las plantas ecuatorianas se pueden utilizar para tratar 77 dolencias. Empleándose 104 especies por su actividad antiinflamatoria, 73 para realizar limpiezas espirituales, 36 como baños calientes para aliviar síntomas de ciertas afecciones, 35 para tratar problemas estomacales, 33 en problemas circulatorios, 30 en tratamientos enfocados a problemas nerviosos, 20 de ellas son aromática, 19 son empleadas en la medicina tradicional posparto y 18 en afecciones cardiacas, tos, resfrío; para el resto de dolencias se utilizan entre 1-13 especies (Cerón Martínez, 2006, p.3).

### **1.4. *Oreocallis grandiflora***

#### **1.4.1 *Descripción***

Es un arbusto pequeño que puede alcanzar una altura de 7 m, posee un tallo con un diámetro máximo de 20 cm. Sus hojas miden aproximadamente 10 cm de largo, por 4 cm de ancho, tienen forma elíptica, carecen de pubescencias y crecen alrededor del tallo en forma espiral. Desarrolla flores distribuidas en inflorescencias en forma de racimo, sus colores varían desde del violáceo, crema, rosa hasta el blanco y alcanzan una longitud aproximada de 3 a 5 cm. Estos atributos se observan en la figura 2-1 (Reynel y Marcelo, 2010, pp.124-125).



**Figura 1-1:** *Oreocallis grandiflora*.

**Fuente:** Bryan Hidalgo, 2019.

Posee frutos que contienen un gran número de semillas, y pueden alcanzar 16 cm de largo, En la tabla 2-1 se puede observar la división taxonómica de la planta (Reynel y Marcelo, 2010, pp.124-125).

**Tabla 2-1:** Clasificación taxonómica de *Oreocallis grandiflora*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Embryobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Proteales
<b>Familia</b>	Proteaceae
<b>Género</b>	<i>Oreocallis</i>
<b>Especie</b>	<i>grandiflora</i> (Lam.) R. Br

**Fuente:** Acevedo & Ríos, 2007, p. 6

**Realizado por:** Bryan Hidalgo, 2019.

#### 1.4.2 *Hábitat*

El género *Oreocallis* está conformado por cinco especies repartidas en Australia, Nueva Guinea Ecuador y Perú. En Ecuador se localiza en las provincias de Chimborazo, Bolívar, Azuay,

Guayas, Zamora Chinchipe y Loja. Puede crecer a una altura de 1000 hasta 4000 m s.n.m (Espinoza, 2010, p.20).

Puede adoptar diferentes nombres comunes en dependencia de la región donde se desarrolla, en Ecuador se denomina cucharilla, cucharillo, gañal, galvay, galluay, galguay; y en Perú atash, saltaperico y chacpa (Espinoza, 2010, p.20).

#### 1.4.3 *Usos etnobotánicos*

Las hojas de *O. grandiflora* se mastican para proteger las piezas dentales y prevenir las caries, sus flores se utilizan en infusión para reducir la fiebre, nefritis, malestares de la gripe, afecciones hepáticas, sus efectos puede potenciarse si se combina con otras especies como el toronjil y la manzanilla. Sus propiedades terapéuticas se deben principalmente al ácido tánico que contiene (Tene *et al.*, 2007, p.12).

Los frutos se emplean en forma de emplastos para curar hernias y fracturas, la parte carnosa del fruto se mezcla con flores de *Alstroemeria caldasii Kunth*, bicarbonato de calcio, y se aplica sobre la parte afectada. Las flores y hojas se combinan con leche de magnesia para tratar quemaduras de primer y segundo grado (Ríos y Acevedo, 2007, p.5).

A parte de sus usos medicinales, los tallos sirven para confeccionar cabos de azadones, yugos, arados e incluso viviendas. Las personas de las zonas rurales siembran esta especie alrededor de sus cultivos para protegerlos de heladas y viento. En otras zonas como en el Perú, debido a la maleabilidad de sus tallos, sirve para elaborar canastos que son comercializados en los mercados locales (Acevedo y Ríos, 2007, p.6).

#### 1.4.4 *Estudios de sus actividades biológicas.*

En el estudio realizado por Sisa Patricia se comprobó que el extracto de acetato de etilo, hexánico y metanólico de *Oreocallis grandiflora* posee actividad gastroprotectora, ya que después de su aplicación en úlceras gástricas inducidas en ratones, se evidenció la cicatrización de la mucosa, con la ayuda del análisis estadístico se encontró que cualquiera de las dosis empleadas es eficaz. Este estudio brinda a la población una posible alternativa fitoterapéutica para el tratamiento de las úlceras gastrointestinales (Sisa, 2012, pp.66-67).

Un estudio para determinar la capacidad antiinflamatoria de *Oreocallis grandiflora*, reveló que el extracto de las hojas a concentraciones de 200, 100 y 50 ppm poseen un porcentaje de

inhibición de 62 hasta 97%, superando considerablemente a la capacidad antiinflamatoria del ácido acetilsalicílico utilizado como control positivo. Las flores también poseen actividad antiinflamatoria pero en menor porcentaje que las hojas. Esta actividad está relacionada con los flavonoides, taninos, terpenoides y fenólicos (Yanza, 2017, pp.68-71).

También se investigó la actividad hipoglucemiante de *O. grandiflora*, donde se encontró que el extracto acuso de la planta a una concentración de 0.004 mg planta/mL produce una disminución de los niveles de glucosa en sangre, debido a la inhibición de la enzima alfa-amilasa en el intestino delgado, y a una concentración de 0.08 mg planta/ mL produce una acción similar a Acabarosa utilizado como tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (Guerrero, 2013, p.65).

En otro estudio realizado por Cajamarca Santiago se encontró que los extractos de las hojas de *Oreocallis grandiflora* presentan actividad fotoprotectora *in vitro*, relacionada con la presencia de flavonoides. Además después de aplicar los extractos sobre colonias de *E. Coli*, se encontró que hubo un alto porcentaje de supervivencia, principalmente con el extracto de mayor concentración (2000 ppm). Estos extractos se pueden incorporar en fotoprotectores solares, de manera que sean más accesible y seguros para la población (Cajamarca, 2016, pp.53-61).

## **1.5. *Passiflora manicata***

### **1.5.1 *Descripción***

Es un arbusto trepador que puede alcanzar los 7 metros de altura. Posee un tallo anguloso y robusto que en ocasiones presenta pubescencia. Las hojas presentan pubescencias, miden de 1.6 a 2.6 cm de largo y son semiovalada, con salientes agudas en los bordes. En la figura 1-1 se puede apreciar estas características (Checa, Rosero y Eraso, 2011, p.5).



**Figura 2-1:** *Passiflora manicata*.

**Fuente:** Bryan Hidalgo, 2019.

Las flores son de color escarlata, con pétalos oblongos, de copa floral reflexa y orientación erecta. El fruto es subsférico u ovoide, con una longitud de 3 a 5 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho, es lampiño, brillante y refleja una tonalidad verde oscura cuando está maduro; en su interior aloja semillas de color morado oscuro (Checa, Rosero y Eraso, 2011, p.5).

**Tabla 3-1:** División taxonómica de *Passiflora manicata*.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Orden</b>	Malpighiales
<b>Familia</b>	Passifloraceae
<b>Género</b>	<i>Passiflora</i>
<b>Especie</b>	<i>manicata</i> (Juss.) Pers.

**Fuente:** Free and Open Access to Biodiversity Data, 2013.

**Realizado por:** Bryan Hidalgo, 2019.

### 1.5.2 *Hábitat*

Se encuentra distribuida en Venezuela, el norte del Perú, Colombia y Ecuador. Crecer en forma de enredadera de manera silvestre en climas templados o fríos, a una altitud entre 1.600 y 2.500 metros sobre el nivel del mar. En Ecuador su nombre común es taxo o ayá. y en Colombia la denominan Curuba de monte (Checa, Rosero y Eraso, 2011, p.5).

### 1.5.3 *Usos etnobotánicos*

En Ecuador el color del fruto de *P. manicata* dificulta la diferenciación entre el estado maduro e inmaduro, se sabe que el consumo del fruto inmaduro puede causar efectos psicotrópicos y tóxicos, sin embargo en la provincia del Chota (Cajamarca-Perú) sus frutos son consumidos ocasionalmente por los pobladores. Debido a su resistencia al ataque de nematodos y hongos es utilizada para el mejoramiento genético del taxo, y como planta ornamental debido a la belleza de sus flores (Torres, 2014; Esquerres, 2014).

### 1.5.4 *Estudios de sus actividades biológicas*

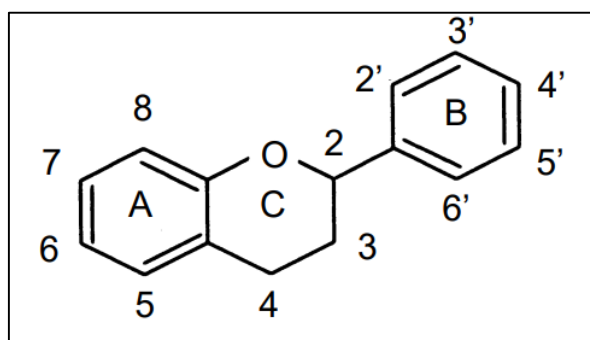
Un estudio realizado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo encontró que los subextractos de *P. manicata* a una concentración de 2000 ppm, brindan fotoprotección en la muerte de *E. coli* inducida por la irradiación con UV-B, observándose un tiempo máximo de descenso después de 210 a 240 minutos para el subextracto etanólico. Los subextractos de acetato de etilo, hexánico y clorofórmicos también exhibieron actividad fotoprotectora al mismo nivel que el estándar de Pamidato-O y octilmetoxicinamato. La fotoprotección del extracto la confieren los compuestos fenólicos y flavonoides de la planta (Santamaría, 2016, p.54).

Silva (2017, p.80), en su estudio “Determinación de la dosis efectiva para actividad ansiolítica del extracto etanólico de hojas de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* en ratones *Mus musculus* mediante administración oral”, encontró que la dosis efectiva de la actividad ansiolítica del extracto liofilizado es de 300 mg/kg. Considerandose como una dosis segura que posee efecto ansiolítico y que no produce efectos secundarios en la actividad motora de los animales de experimentación. .

En el estudio realizado por Da Silva Morrone *et al.*, (2013, pp.5-6), donde se efectuó la evaluación de extracto crudo de *P. manicata* mediante HPLC, se encontró que posee vitexina, isovitexina e isoorientina, que son los flavonoides responsables de la actividad protectora frente a las especies reactivas del oxígeno y también frente a la glicación de proteínas, por lo que podría emplearse como una fuente natural de antioxidantes.

## 1.6. Los flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Son fenilbenzopironas conformadas por la unión de 3 anillos (A, B y C), dos de ellos aromáticos. A partir de su estructura básica existen 13 subclases que dan lugar aproximadamente a 5000 compuestos (Martino, 2000, p.1).



**Figura 3-1:** Estructura básica de los flavonoides.

**Fuente:** Martínez-Flórez et al., 2002, p.2.

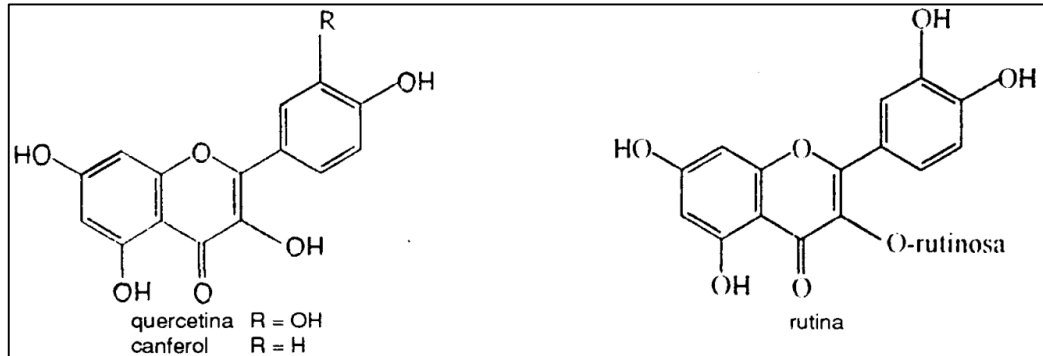
En las plantas son metabolitos secundarios que se encuentran en forma de glucósidos, son los compuestos pigmentantes universales, responsable de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas. Sirven como atractores visuales para los insectos, favoreciendo la polinización, actúan como mecanismo de defensa contra microorganismos e insectos y protegen de la radiación UV debido a su actividad antioxidante. Tienen la capacidad de quelar el hierro, captar especies reactivas del oxígeno, inhibir la lipooxigenasa, NADPH oxidasa, mieloperoxidasa y ciclo-oxigenasa (Bruneton, 1993; Martino, 2000).

### 1.6.1 Toxicidad de flavonoides

Un tóxico es un agente físico o químico que puede causar un efecto nocivo en los seres vivos, como estos son un equilibrio de procesos fisiológicos, un tóxico es capaz de irrumpir dicho equilibrio. Prácticamente cualquier sustancia puede actuar como tóxico, compuestos endógenos como exógenos pueden producir efectos adversos en el organismo, todo depende de las dosis y de condiciones ideales del individuo y el medio ambiente (Repetto Jiménez y Repetto Kuhn, 2013, p.21).

La toxicidad de los flavonoides es insignificante, por ejemplo la DL50 de la rutina es menor a 30 g/kg, la mayoría de los flavonoides son antimutagénicos en modelos *in vitro*, sin embargo pruebas realizadas sobre *Salmonella tiphimurium* han encontrado que algunos flavonoides

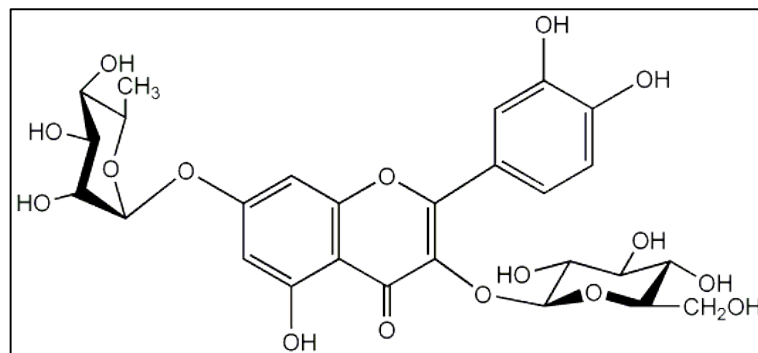
tienen actividad mutagénica, la posición de los grupos OH condiciona esta actividad, tal es el caso del kaempferol, la quercetina y otros derivados flavonoides que presentan grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B o en la posición 3 del anillo C, como se observa en la figura 4-1 (Do Céu Silva et al., 2003; El Hajjouji et al., 2007; Martino, 2000).



**Figura 4-1:** Estructura de la quercetina, rutina y canferol.

Fuente: Martino, 2000, p.2.

Estudios realizados por Engen et al., (2015, pp.5-6), encontraron que los efectos genotóxicos y citotóxicos de los flavonoides disminuyen a medida que aumenta el número de azúcares en su estructura. Los hidratos de carbono de los flavonoides glucosilados hacen que sean más hidrófilos, dificultando su absorción y biodisponibilidad, resultando en menos toxicidad. También encontraron que la ramnosa puede proporcionar resistencia celular a la genotoxicidad inducida por flavonoides. En la Figura 5-1 se puede observar a uno de los flavonoides glucosilados de *O. grandiflora* conocido como quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido.



**Figura 5-1:** Estructura de la quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido.

Fuente: Kanaya, 2018, p.1



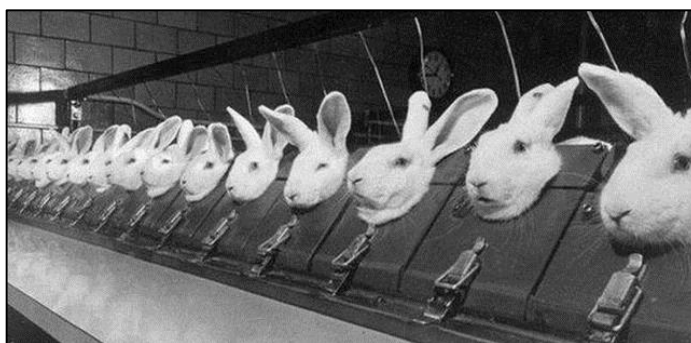
## 1.7. Ensayos *in vivo* de irritación ocular y genotoxicidad.

### 1.7.1 *Ensayos in vivo*

Los ensayos *in vivo* obtienen resultados a partir de animales de experimentación, tales como monos, conejos, cobayos, ratones, ratas o chimpancés. Este tipo de ensayos trata de proporcionar los medios necesarios para que las condiciones sean lo más aproximadas al fenómeno observado en circunstancias reales. En contraposición a estos métodos, se encuentran los métodos *in vitro*, los cuales tratan de aproximarse a las condiciones donde se realizó la observación o al menos acercarse a las condiciones desarrolladas por los métodos *in vivo* (Fina, Lombarte y Rigalli, 2013, p.2).

### 1.7.2 *Prueba de Draize*

Este ensayo sirve para medir parámetros de irritación e inflamación de una sustancia, el puntaje de irritación está relacionado con el grado de daño producido en el globo ocular de un conejo. No obstante, en la actualidad es uno de los ensayos más controversiales, no solo por los aspectos humanitarios, sino por la subjetividad y variabilidad de sus observaciones. Por eso es necesario implementar nuevas alternativas *in vitro* que permitan obtener datos extrapolables a este método, además que sean menos costosas y más fáciles de realizar. Sin embargo, a pesar de las duras críticas que ha recibido, este ensayo ha permitido clasificar sustancias que causan irritación leve y moderada, y que son difíciles de identificar con otros métodos (Silbergeld, 2000, p.54).



**Figura 6-1:** Conejos de laboratorio listos para realizarse el test de Draize.

Fuente: Páez 2017, p.1

### 1.7.3 ***Prueba de Genotoxicidad sobre células de medula ósea de ratones***

Esta prueba se realiza sobre células de la medula ósea de ratones, extraídas a través de dislocación cervical, donde la actividad genotóxica es evaluada después de administrar por vía gástrica diversas concentraciones de una sustancia. Los datos de esta prueba se obtienen mediante la cuantificación del número de eritrocitos policromáticos que presentan micronúcleos, que luego se expresa como porcentaje en relación a 1000 hematíes policromáticos observados. Estos datos sirven para determinar la toxicidad de las sustancias a través del valor obtenido de la relación entre hematíes policromáticos y hematíes normocromáticos, y también el índice de genotoxicidad, mediante el porcentaje de hematíes policromáticos con micronúcleos, cuyos resultados se comparan con controles positivos (Montero *et al.*, 2001, pp.3-4).

## 1.8. **Ensayos *in vitro* de irritación ocular y genotoxicidad.**

### 1.8.1 ***Ensayos in vitro***

Los métodos *in vitro* son aquellos que se realizan fuera de estructuras anatómicas de animales, vegetales o seres humanos, es decir sobre sus tejidos o células. El término “*in vitro*” se refiere a los procedimientos que se aplican sobre material biológico en condiciones específicas, mediante el uso de tubos de ensayo o cajas Petri. Aunque existe dificultad para reproducir o proyectar los efectos tóxicos que produce una sustancia en un individuo complejo, utilizando un solo tipo de células; los ensayos de toxicidad “*in vitro*” sí proporcionan información confiable acerca de la toxicidad intrínseca, así como de sus mecanismos moleculares y celulares. Además son métodos cuya aplicación no representa grandes costos, sus resultados pueden resultar más confiables ya que se tiene más control de las condiciones en las que se desarrollan los experimentos (Silbergeld, 2000, p.52).

### 1.8.2 ***Ensayo de la irritación ocular por el método HET-CAM.***

El ensayo del huevo de gallina de la membrana corioalantoidea (MCA), más conocido por las siglas HET-CAM debido a su nombre en inglés “*Hen’s egg test on chorioallantoic membrane*”, es una prueba *in vitro* desarrollada por Lupke, modificada por Spielmann y por Steiling, que ayuda a determinar el potencial irritativo de una sustancia o producto terminado (Murillo *et al.*, 2003, p.1).



**Figura 7-1:** Membrana corioalantoidea de huevo de gallina.

**Fuente:** Bryan Hidalgo, 2019.

La obtención de los datos se basa en la aplicación de sustancias sobre la membrana corioalantoidea de un huevo de gallina de aproximadamente diez días de incubación, donde se hace una evaluación visual durante cinco minutos, para determinar si existe coagulación, lisis y hemorragia en los vasos sanguíneos de la membrana (Murillo *et al.*, 2003, p.1)..

El método HET-CAM es más barato de realizar que los ensayos *in vivo*, su procedimiento es más sencillo, y sobre todo no necesita equipos especializados para obtener los resultados. Es utilizado principalmente por la industria cosmética para hacer pruebas toxicológicas preliminares de sus productos (Murillo *et al.*, 2003, p.1).

### 1.8.3 *Ensayo de la irritación ocular por el método CAM-TBS.*

Este ensayo fue implementado por Hagino entre el año 1991 y 1993, basándose en el “protocolo “N° 108 de las pruebas *in vitro* en Toxicología (INVITTOX, *The In vitro Techniques in Toxicology*, por sus siglas en inglés)” (Hagino *et al.*, 1993, pp.2-3).

Ésta prueba a diferencia del método HET-CAM permite obtener datos cuantitativos de la capacidad irritante de las sustancias después de ser aplicadas en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina. Este método ayuda a obtener datos más objetivos que el método HET-CAM (Hagino *et al.*, 1993, pp.2-3).

Los investigadores al observar que los cambios producidos en la membrana corioalantoidea tienen buena correlación con los que se producen en el tejido ocular después de aplicarse las mismas sustancias, vieron la necesidad de eliminar el carácter subjetivo del método HET-CAM mediante el uso del colorante azul tripán. La membrana celular cuya integridad ha sido afectada se tiñe por el colorante, esto se produce por la afinidad que tiene el colorante por las proteínas liberadas después de romperse la membrana celular (Hagino *et al.*, 1993, pp.2-3).

La cantidad de azul tripán absorbido es directamente proporcional al daño causado en las estructuras celulares de los vasos sanguíneos de la membrana, al ser utilizado como tinción también sirve para determinar la viabilidad celular, al correlacionar la destrucción y desnaturalización de la membrana (Hagino *et al.*, 1993, pp.2-3).

#### 1.8.4 *Evaluación de la genotoxicidad mediante el test de micronúcleos en Vicia faba.*

Para determinar la capacidad genotóxica que tienen los extractos de plantas se puede utilizar el test de micronúcleos en *Vicia faba var. minor*, este es un bioensayo sobre el cual se ha probado una gran cantidad de agentes químicos, además es económico y fácil de realizar. En la figura 8-1 se puede observar las semillas de *vicia faba*, conocidas comúnmente como habas (Ma et al. 1995, p.1).

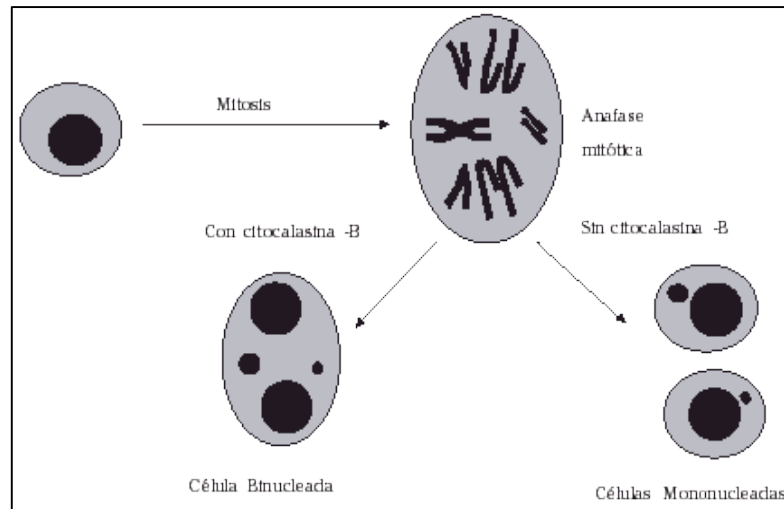


**Figura 8-1:** Semillas de *Vicia faba var. minor*.

**Fuente:** ECOGRANS, 2014, p.1.

Este test se basa en el uso de las raíces primarias, las cuales son expuestas a las sustancias por un periodo de tiempo determinado, para luego teñirlas con colorantes apropiados y observar en sus células la formación de micronúcleos e inducción o inhibición de la mitosis. Es una prueba confiable, cuyos datos tienen buena correlación con ensayos de genotoxicidad *in vivo*, como los que emplean las células de médula ósea de ratón (Khadra *et al.*, 2012, p.2).

La micronúcleos evaluados mediante este test se produce por la acción de agentes genotóxicos sobre el ADN y los constituyentes celulares relacionados con el desplazamiento de los cromosomas en el paso de metafase a anafase, lo que provoca que porciones o cromosomas enteros queden rezagados y formen pequeños núcleos que no se unen al núcleo de la célula hija. Este proceso se ilustra en la figura 1-1.



**Figura 9-1:** Formación de micronúcleos.

**Fuente:** Zalacain, Sierrasesúmaga y Patiño, 2005, p.3.

### 1.8.5 *Test de Ames*

Otro método para evaluar la genotoxicidad es el test de Ames, que se basa en el uso de compuestos mutagénicos sobre *Salmonella tiphimurium*, que tienen la capacidad de revertir la mutación de un gen codificante para la síntesis de una enzima, haciendo que la bacteria se desarrolle en un medio deficiente de histidina, mientras que las no mutadas mueren. Este ensayo se realiza con la ayuda de una fracción postmitocondrial hepática de especies inducidas (Repetto Jiménez y Repetto Kuhn, 2013, p.458).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Lugar de la investigación

La investigación se efectuó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, localizada en el cantón Riobamba perteneciente a la provincia de Chimborazo.

#### 2.2. Recolección del material vegetal

La materia vegetal de *Oreocallis grandiflora* y *Passiflora manicata* se recolectó en la comunidad Miraflores, Parroquia Cañi, Cantón Colta, Provincia de Chimborazo, a una altura promedio de 2833 m s.n.m. La investigación se realizó bajo el contrato de acceso a recursos genéticos suscrito entre la ESPOCH y el Ministerio del Ambiente del Ecuador MAE-DNB-CM-2018-0086. La portada de este contrato se puede observar en el anexo B.

**Latitud:** 1° 46' 34'' S

**Longitud:** 78° 59' 04'' W

#### 2.3. Identificación del material vegetal

Para la identificación se recolectaron las muestras vegetales y se identificaron a través del Ingeniero Jorge Caranqui el cual es responsable del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.4. Preparación de la materia vegetal

Las hojas de *Passiflora manicata* y *Oreocallis grandiflora* se seleccionaron de acuerdo a criterios de inclusión, observando que estén en buen estado, con vigorosidad, de unos tamaños adecuados, cuyas partes estén frescas e íntegras, y de acuerdo a criterios de exclusión,

verificando que estén libres de insectos, y que no presenten algún deterioro por condiciones ambientales como el viento, agua o calor.

Luego del proceso de selección, las hojas fueron lavadas y desecadas en una estufa a 50 °C por un periodo de tiempo adecuado. Posteriormente se trituraron en un molino de marca Arthur H, Tomas C.O, con el objetivo de disminuir el tamaño de la materia vegetal y facilitar el proceso de extracción, finalmnete se almacenaron en recipientes adecuados.

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

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

La determinación del contenido de humedad se realizó utilizando un método gravimétrico que consiste en la pérdida de masa a través del secado en una estufa. Para este ensayo se empleó 2 gramos de planta seca y triturada, la misma que se situó en una capsula de porcelana previamente tarada, que luego se introdujo en una estufa por 3 horas a una temperatura de 105 °C. Cumplido el tiempo se retiró la cápsula y se situó en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Nuevamente se trasladó la capsula a la estufa por alrededor de una hora y nuevamente se colocó en el desecador. Repitiéndose el proceso hasta alcanzar una masa constante, el porcentaje de humedad se calculó a través de la siguiente fórmula (Miranda y Cuellar, 2001, pp.34-35).

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

#### **Donde:**

**%H**= Porcentaje de pérdida de peso por desecación (%)

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

**M<sub>2</sub>**= masa de la cápsula con la muestra (g)

**M**= masa de la cápsula vacía (g)

**100**= factor matemático

### 2.5.2 *Determinación de cenizas totales*

Se ejecutó mediante el método gravimétrico, que se basa en la obtención de cenizas a través de la incineración de la muestra. Para este ensayo fue necesario pesar en un crisol previamente tarado 2 g de muestra seca y triturada, con una variación de  $\pm 0.5$  g. La muestra se carbonizó en un reverbero hasta que no observar desprendimiento de humo, luego se introdujo el crisol en un horno mufla a una temperatura de  $700\pm 50$  °C, por un periodo de tiempo de 2 horas. Cumplido este tiempo se colocó en un desecador hasta que el crisol llegue a temperatura ambiente y posteriormente se pesó. Nuevamente se trasladó el crisol al horno mufla por una hora más, luego se introdujo en el desecador y se pesó. Este proceso se repitió hasta que las cenizas estén completamente blancas y su masa sea constante. Para determinar las cenizas totales se empleó la siguiente fórmula (Miranda y Cuellar, 2001, p.32).

$$\%Ct = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

#### **Dónde:**

**%Ct** = Porcentaje de cenizas totales (%)

**M<sub>1</sub>** = masa del crisol con la muestra seca (g)

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

**M** = masa del crisol vacío (g)

**100** = factor matemático

### 2.5.3 *Determinación de cenizas solubles en H<sub>2</sub>O*

Se realizó mediante el método gravimétrico, donde se utilizó las cenizas totales obtenidas anteriormente, a las cuales se les adicionó  $20\pm 5$  mL de agua destilada, luego se tapó con un vidrio reloj y se calentó en baño maría por un periodo de 5 minutos. Posteriormente se filtró, y el material retenido junto con el papel filtro se colocó en el crisol y se carbonizó en un reverbero hasta no observar desprendimiento de humo. La muestra carbonizada se introdujo en un horno mufla a  $700\pm 50$  °C por 2 horas. Después se introdujo en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente y se pesó. Se continuó con este proceso a intervalos de media hora, hasta que las cenizas estén completamente blancas y su masa sea constante. Finalmente se calculó las cenizas insolubles en H<sub>2</sub>O mediante la siguiente fórmula (Miranda y Cuellar, 2001, p.33).



$$\%Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} \times 100$$

**Dónde:**

**%Ca** = Porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada (%)

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

**M<sub>a</sub>** = masa del crisol con las cenizas insolubles en H<sub>2</sub>O (g)

**M<sub>1</sub>** = masa del crisol con la muestra seca (g)

**M** = masa del crisol vacío (g)

**100** = factor matemático

#### 2.5.4 *Determinación de cenizas insolubles en HCl*

Se realizó mediante el método gravimétrico, donde se utilizó las cenizas totales obtenidas anteriormente, a estas se adicionó  $2.5 \pm 0.5$  mL de HCl, posteriormente se tapó el crisol con un vidrio reloj y se calentó en baño maría por 10 minutos. El vidrio reloj fue lavado y la solución se unió al contenido del crisol. Luego se filtró y el residuo retenido se lavó con agua caliente hasta que en la solución filtrada no hubo presencia de cloruros después de añadir tres gotas de AgNO<sub>3</sub> 0.1 M. El filtrado junto con el material retenido en el papel filtro se secó en una estufa a 105°C, se trasladó al crisol inicial y se introdujo en un horno mufla a  $700 \pm 50$  °C por 2 horas. Después se introdujo en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente y se pesó. Se repitió este proceso cada media hora, hasta que las cenizas estén completamente blancas y su masa sea constante. Finalmente se calculó las cenizas insolubles en HCl mediante la siguiente fórmula (Miranda y Cuellar, 2001, p.33).

$$\%B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

**Dónde:**

**%B** = Porcentaje de cenizas insolubles en HCl en base hidratada (%)

**M<sub>2</sub>** = masa del crisol con las cenizas insolubles en HCl (g)

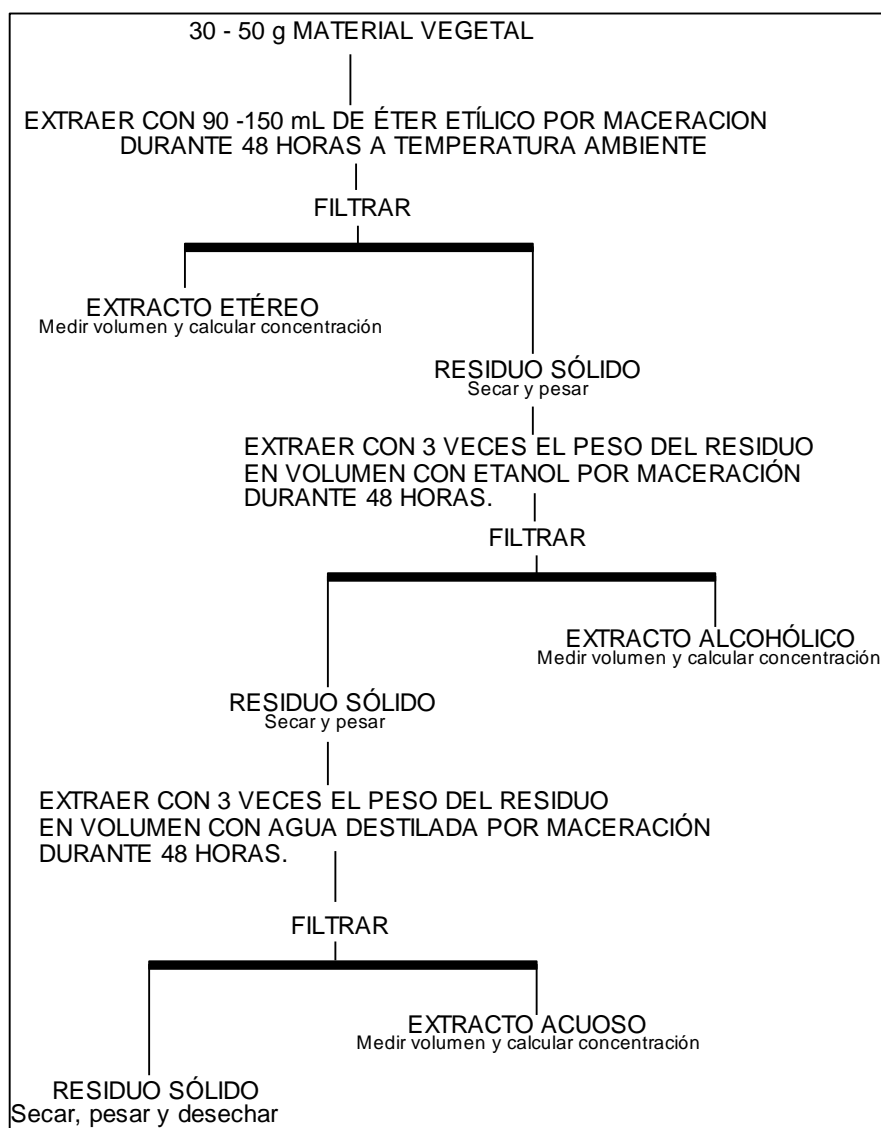
**M<sub>1</sub>** = masa del crisol con la muestra seca (g)

**M** = masa del crisol vacío (g)

**100** = factor matemático

## 2.6. Tamizaje fitoquímico

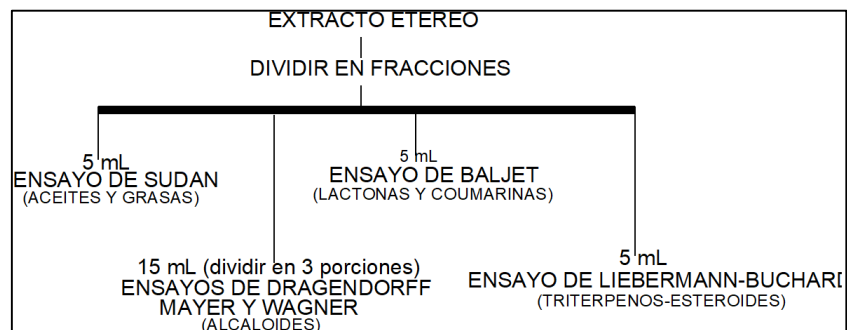
El tamizaje fitoquímico es un conjunto de ensayos basados en reacciones de coloración y precipitación, que permitieron la identificación cualitativa de principios activos en *Passiflora manicata* y *Oreocallis grandiflora*. Para realizar estos ensayos se pesó entre 30 a 50 gramos de planta seca y se extrajo en un volumen de solvente 3 veces mayor al peso de la materia vegetal, realizándose extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente, para lograr extraer la mayor cantidad de principios activos. Entre los solventes utilizados están el dimetiléter, etanol y el agua. Este proceso se detalla en la siguiente figura.



**Figura 1-2:** Procedimiento para efectuar el tamizaje fitoquímico.

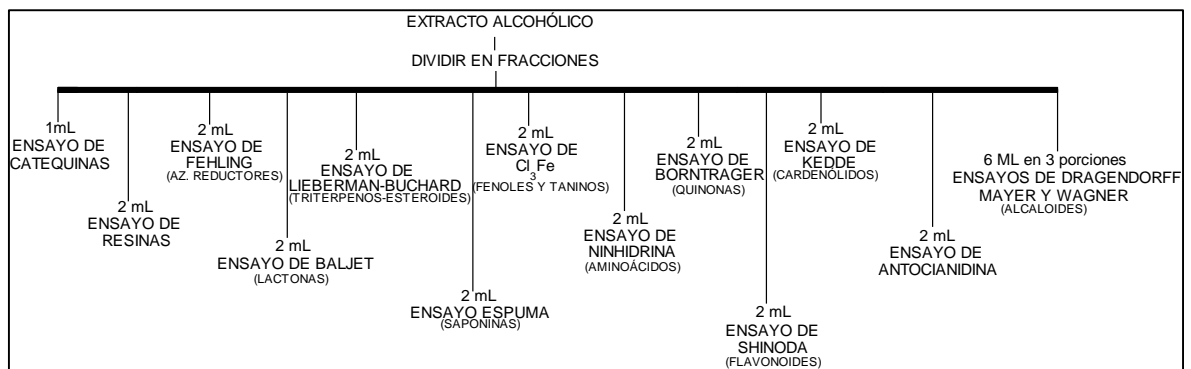
Fuente: Miranda y Cuellar, 2001.

Después de obtener los diferentes extractos, se efectuó los ensayos correspondientes para cada tipo de extracto, de manera que se identificaron los metabolitos secundarios que poseen las plantas, estos procesos se detallan en las siguientes figuras.



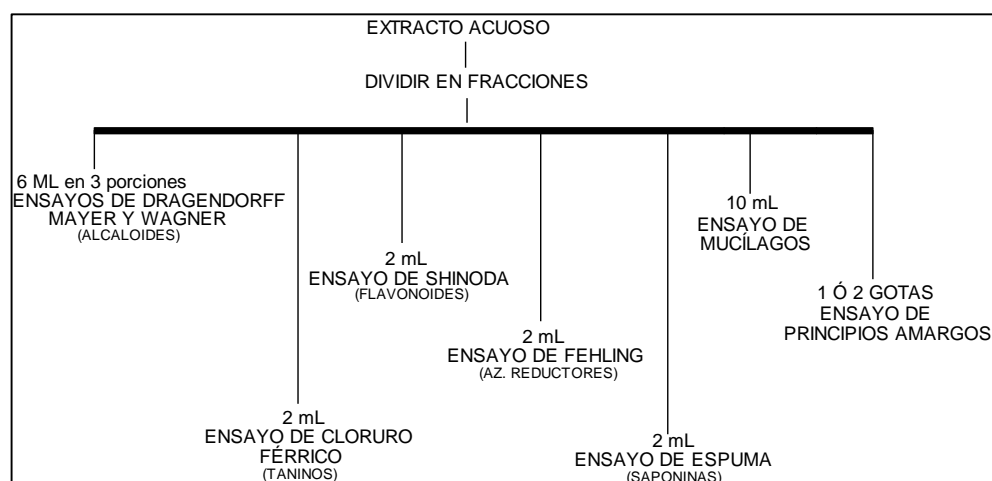
**Figura 2-2:** Proceso de reacciones a efectuarse en el extracto etéreo.

Fuente: Miranda y Cuellar, 2001.



**Figura 3-2:** Proceso de reacciones a efectuarse en el extracto alcohólico.

Fuente: Miranda y Cuellar, 2001.



**Figura 4-2:** Proceso de reacciones a efectuarse en el extracto acuoso.

Fuente: Miranda y Cuellar, 2001.

## 2.7. Obtención y estandarización del extracto de *P. manicata* y *O. grandiflora*.

Para obtener el extracto hidroalcohólico se pesó 100 g de cada planta, se introdujo en un frasco ámbar y se añadió 100 mL de etanol a una concentración del 70%, a una proporción planta solvente de 10:100. Para optimizar la extracción de los principios activos de las plantas se homogenizó por 72 horas en un Orbital Shaker de marca Esco ISOCIDE™, luego se filtró para eliminar todos los residuos de planta. Por último el extracto se trasvasó a un balón de destilación apropiado y se concentró en el rotavapor de marca BUCHI 461, a 60°C y a 1500 revoluciones por minuto, hasta que se evaporó el etanol y se obtuvo el extracto seco.

Luego se realizó la caracterización organoléptica, evaluando el color, olor, sabor, y el rendimiento. Para determinar el porcentaje de rendimiento se empleó la siguiente fórmula.

$$\%R = \frac{M_1 - M_2}{M} \times 100$$

**Dónde:**

**%R** = Porcentaje de rendimiento del extracto seco (%)

**M<sub>1</sub>** = masa del balón de destilación con el extracto seco (g)

**M<sub>2</sub>** = masa del balón de destilación vacío (g)

**M** = masa de la materia vegetal utilizada para realizar el extracto hidroalcohólico (g)

**100** = factor matemático

## 2.8. Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales de *Passiflora manicata* y *Oreocallis grandiflora* fue realizada mediante un método espectrofotométrico, este se basa en una reacción colorimétrica de óxido reducción, donde la sustancia oxidante fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Gracia, 2009, p.2).

Antes de determinar los fenoles totales presentes en los extractos de cada planta, se realizó una curva de calibración de ácido gálico, preparando soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Primero en balones de aforo de 25 mL se adicionó 250 µL de las soluciones de ácido gálico a diferentes concentraciones, se agregó 15 mL de agua desionizada y 1.25 mL de reactivo Folin-

Ciocalteu, con la ayuda de un agitador Vortex se homogenizó las muestras durante 30 segundos y se dejó en reposo por un periodo de 8 minutos. Luego se adicionó 3.75 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5% y se aforó a 25 mL, se vortizó por 15 segundos y se dejó reposar por 120 minutos en un lugar oscuro. Por último se realizó la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm (Ortíz, Guitiérrez y Andrés, 2004, p.3).

Después de obtener la curva de calibración del ácido gálico ( $y = 0.0008x + 0.0133$ ) se preparó por triplicado muestras del extracto seco de las dos especies vegetales a una concentración de 100 ppm, utilizando como solvente etanol al 70%. Las muestras fueron procesadas de la misma forma que los estándares. Por último se calculó el contenido de fenoles totales expresados como mg EAG /g extracto seco (miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco) (Palomino et al., 2009, p.4).

## **2.9. Determinación de flavonoides totales**

La determinación de flavonoides totales se fundamenta en una reacción colorimétrica entre el  $\text{AlCl}_3$  y los flavonoides presentes que forman un complejo de color rosado, posteriormente se mide la absorbancia a través de un espectrofotómetro (Soares et al., 2003, p.2).

Previamente a la determinación de flavonoides de los extractos, se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Primero se adicionó en tubos de ensayos apropiados 1000  $\mu\text{L}$  de cada solución estándar, junto con 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  al 5%, se homogenizó en un agitador vortex y se dejó reposar por 5 minutos en un lugar oscuro. Luego se agregó 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$ , se vortizó por 60 segundos y nuevamente se dejó reposar en un lugar oscuro por 5 minutos. Después de este periodo de tiempo se agregó 2000  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  a una concentración 1N, se homogenizó en un agitador vortex por 15 segundos y se dejó reposar en un lugar oscuro durante 15 minutos, finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm (Jáuregui et al., 2014, p.3).

Después de obtener la curva de calibración de la quercetina ( $y = 0.002x + 0.0056$ ), se preparó por triplicado muestras del extracto seco en etanol al 70% a una concentración de 100 ppm, y se procedió de la misma forma que los estándares. Finalmente se calculó el contenido de flavonoides totales expresados como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg EQ/g extracto seco) (Garrido y Ortiz, 2013, p.1).

## 2.10. Determinación de la irritación ocular por el método HET-CAM.

Para esta prueba, el extracto seco de *Passiflora manicata* y *Oreocallis grandiflora* se disolvió en agua destilada a concentraciones de 200, 500, 1000 y 3000 ppm. Se empleó huevos de gallina fértiles, los cuales fueron colocados en una incubadora automática de marca HHD durante 10 días, con una humedad relativa de  $63 \pm 7 \%$  y a una temperatura de  $37.5 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  (ICCVAM, 2010, p.5).

Cumplido este periodo, se removió la cáscara alrededor de la cámara de aire con la ayuda de una tijera o navaja, para facilitar la extracción de la membrana blanquecina que protege la membrana corioalantoidea se humedeció con 5 gotas de suero fisiológico. Se utilizó como control positivo NaOH 0.1 M y como control negativo suero fisiológico. Para cada concentración y controles, se utilizó tres huevos de gallina (Reis Mansur et al., 2016, p.4).

Una vez expuesta la membrana corioalantoidea se aplicó 300  $\mu\text{L}$  de las soluciones de los extractos, y se realizó un análisis visual de los vasos sanguíneos de la membrana durante 5 minutos, registrando el tiempo de aparición, medido en segundos, de cada efecto irritante (coagulación, lisis y hemorragia), para obtener el puntaje de irritación (IS) se empleó la siguiente fórmula (Costa et al., 2015, pp.2-3).

$$IS: \frac{(301 - H)x5}{(300)} + \frac{(301 - L)x7}{(300)} + \frac{(301 - C)x9}{(300)}$$

**Dónde:**

**H** = El tiempo que se demora en aparecer las reacciones de hemorragia.

**L** = El tiempo que se demora en comenzar la lisis vascular.

**C** = El tiempo que se demora en empezar la coagulación.

Los extractos se clasificaron en cuatro categorías, de acuerdo al puntaje de irritación calculado, no irritante ( $IS < 1$ ), bajo irritante ( $1 \geq IS < 5$ ), moderadamente irritante ( $5 \geq IS < 9$ ) e irritante ( $IS \geq 9$ ) (Debbasch et al., 2005, p.2).

## 2.11. Determinación de la irritación ocular por el método CAM-TBS.

El test CAM-TBS es un método cuantitativo que tiene buena correlación con el test de Draize, se basa en el uso de azul tripán como indicador del daño que se produce en la membrana

corioalantoidea, ya que tiene la capacidad de unirse a los tejidos dañados (Liebsch y Spielmann 2002, p.6).

Antes de evaluar el potencial irritante de los extractos de *P. manicata* y *O. grandiflora*, se elaboró una curva de calibración mediante la disolución del colorante azul tripán en dimetil formamida, a concentraciones de  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  y  $5 \times 10^{-5}$  M (Lagarto *et al.*, 2006, p.2).

Para evaluar cada sustancia se utilizó tres huevos de gallina, al día 10 de incubación se eliminó la cascara sobre la cámara de aire, la membrana que protege la CAM se humedeció con una gota de solución salina para facilitar su extracción. Se aplicó una alícuota de 200  $\mu$ L de los extractos durante 20 segundos y luego se lavó con solución salina (Hagino *et al.*, 1993, pp.2-3).

Luego se añadió 500  $\mu$ L de una solución de azul tripán al 0.1% (disuelto en una solución buffer de fosfato salino), en un área limitada por un anillo de silicona de 18 mm de diámetro. El exceso de TBS se enjuagó con suero fisiológico, y la CAM limitada por el anillo de silicona se extirpó con tijeras, se pesó en una balanza analítica y se colocó en 5 mL de dimetil formamida, luego se agitó enérgicamente por 15 segundos y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Por último se separó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 595 nm. La cantidad de azul tripán absorbido por la CAM fue proporcional a las lesiones causadas por los extractos, cuya concentración se calculó mediante la siguiente fórmula (Reis Mansur *et al.*, 2016, p.4).

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

**Dónde:**

**TBS** = Cantidad de colorante absorbido

**d** = Concentración de colorante (obtenido por extrapolación mediante la curva de calibración) /mg de membrana

Se clasificó cada extracto mediante la puntuación obtenida a través del 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.3).

## **2.12. Determinación de la genotoxicidad en *Vicia faba* var. minor.**

Para determinar el potencial genotóxico de los extractos de *P. manicata* y *O. grandiflora* se empleó el test de micronúcleos, que se basa en la capacidad que tiene una sustancia para causar daño en el ADN y en los constituyentes celulares relacionados con el comportamiento de los

cromosomas en la célula; esto se ve reflejado en la formación de micronúcleos y la disminución del índice mitótico (Ma *et al.*, 1995, pp.3-6).

Para realizar esta prueba se almacenó las semillas de *Vicia faba* variedad menor durante 2 horas a 4°C, para luego ser remojadas en agua destilada por 24 horas. Cumplido este tiempo se retiró las cascaras y se colocaron entre dos capas de algodón humedecido. Después de 3 a 5 días, se seleccionaron al azar 3 semillas con raíces primarias de 2-3 cm de largo y se sumergieron en los extractos a concentraciones de 1, 0.4, 0.2 y 0.1%, por un periodo de 48 horas. Como control positivo se utilizó Etanol absoluto y como control negativo agua destilada (García-Bores *et al.*, 2017, p.3).

Cumplido el periodo de exposición de las radículas, se sumergieron en agua destilada durante 48 horas para el periodo de recuperación. Luego del periodo de recuperación se cortó las raíces y se sumergió en una solución de Farmer (25 mL de ácido acético y 75 mL de metanol) a 4° C, durante 24 horas. Después se colocó las raíces en Etanol al 70 % durante 15 minutos, para deshidratar las células y facilita la penetración del HCl. Posteriormente se sumergió en una solución de HCl 5N a  $55 \pm 5$  °C durante 30 minutos, para hidrolizar los enlaces de la pared celular, seguidamente se lavó las raíces tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de HCl (Prieto García *et al.*, 2006, p.2).

Después se colocó las radículas en una capsula de porcelana y se añadió Orceína al 1%, se calentó la capsula con la ayuda de un reverbero hasta observar desprendimiento de vapores y se enfrió durante 2-3 minutos, este proceso se realizó por triplicado. Con la ayuda de un pincel o una pinza se retiró las radículas de la capsula de porcelana, y sobre un porta objetos se cortó la región meristemática de la raíz (1 mm de longitud por encima de la punta de la raíz) y la región F1 (1 mm de longitud por encima de la zona meristemática). Posteriormente se colocó un cubre objetos y se presionó entre una hoja de papel absorbente para que las células se dispersen y se facilite la observación en el microscopio (Olivares, Gaete y Neaman 2015; Ma *et al.*, 1995).

Por último se realizó el conteo de 1000 células por cada tratamiento (1000 células para la región meristemática y 1000 células para la región F1), tomando en cuenta que en la región meristemática se anotan el número de células que se encuentran en las diferentes etapas de la mitosis y en la región F1 el número de células con micronúcleos. Para calcular el índice mitótico y el índice de micronúcleos se empleó las siguientes fórmulas (García-Bores *et al.*, 2017, p.3).



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

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

### **2.13. Análisis estadístico del test de MCNs en *vicia faba*.**

El ensayo de genotoxicidad fue sometido a un análisis estadístico por medio del programa IBM SPSS STATISTICS 23, a través del cual se analizó por separado el índice mitótico y el índice de micronúcleos. Para determinar el test a emplear para el análisis de los datos, primero se realizó la prueba de normalidad con el test de Shapiro Wilk, una vez determinado que los datos obtenidos son normales se procedió a realizar la prueba de homogeneidad de varianzas, empleando el estadístico de Levene, luego se realizó el test de ANOVA de un factor para comparar las medias de los tratamientos y comprobar la Hipótesis alternativa de que los extractos no poseen actividad genotóxica. Por último se aplicó el test de Tukey para comprobar la independencia de los tratamientos frente al control negativo.

Para analizar los datos del índice de micronúcleos, como el caso anterior se realizó un análisis previo para comprobar que los datos sean normales mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, sin embargo se determinó que no son normales, por lo cual se utilizó una prueba no paramétrica conocida como el test de Chi-cuadrado, donde se evaluó la independencia de las concentraciones de los extractos con el control negativo a través del valor de p.

## 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 es de vital importancia para determinar que se encuentra en óptimas condiciones, y pueda ser utilizada con fiabilidad en la investigación, de manera que no interfiera en los resultados obtenidos. Entre los criterios de calidad se encuentran el contenido de humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico; los mismos que se especifican en las tablas 1-3 y 1-4.

**Tabla 1-3:** Resultados del control de calidad de *Passiflora manicata*.

Parámetro (%)	<i>Passiflora manicata</i>	Valores de referencia de acuerdo a la Real Farmacopea Española 2002
Humedad	6.9337	14
Cenizas totales	3.0559	5
Cenizas insolubles en HCl	0.05	1
Cenizas solubles en H <sub>2</sub> O	0.70	2

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 2-3:** Resultados del control de calidad de *Oreocallis grandiflora*.

Parámetro (%)	<i>Oreocallis grandiflora</i>	Valores de referencia de acuerdo a la Real Farmacopea Española 2002
Humedad	5.4607	14
Cenizas totales	1.9223	5
Cenizas insolubles en HCl	0.067	1
Cenizas solubles en H <sub>2</sub> O	0.73	2

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

### 3.1.1 *Contenido de humedad*

El contenido de humedad de las drogas vegetales se determinó por un método gravimétrico que consistió en la pérdida de peso por secado. El resultado obtenido para *P. manicata* fue de 3.0559 % y para *O. grandiflora* fue de 5.4607 %, esto indica que la humedad se encuentra dentro de los parámetros de calidad establecidos por la Real Farmacopea Española del 2002.

Cajamarca (2016, p.58), identificó un valor de 11.12 % en *O. grandiflora* y Santamaría (2016, p.46), un valor de 12.45 % para *P. manicata*, al comparar con el presente estudio el porcentaje de humedad fue mayor ya que en los dos casos el secado se hizo a temperatura ambiente, que disminuyó la eficiencia del secado. La baja humedad en este estudio se debe al proceso de acondicionamiento de la materia vegetal, una vez recolectada se colocó en una estufa hasta que las hojas perdieron toda característica de turgencia, una vez triturada se guardó en recipientes herméticos e inmediatamente se efectuó el control de calidad.

El contenido de humedad determinado asegura que los microorganismos y la actividad enzimática no causen degradación de los metabolitos secundarios, garantizando de esta forma la estabilidad de la materia vegetal en el transcurso de la investigación (Rébuba, Pany y Bombarda, 2018, p.4).

### 3.1.2 *Contenido de cenizas totales*

El contenido de cenizas totales se determinó por un método gravimétrico, que se basa en la eliminación de la materia orgánica mediante incineración de la materia vegetal en una mufla. Los resultados obtenidos se encuentra dentro de las especificaciones establecidas por la Real Farmacopea Española del 2002 (5 %), ya que se obtuvo un valor de 3.0559 % y 1.9223 % para *P. manicata* y *O. grandiflora* respectivamente.

El contenido de cenizas totales está relacionado con la presencia de materia inorgánica (minerales), un valor alto refleja contaminación con materia inorgánica externa en el proceso de recolección de las plantas, tales como metales pesados o tierra. Los resultados de este ensayo dan fiabilidad de uso de las especies vegetales en la investigación (Moreno, Marín y Peña, 1999, pp.2-4).

Sisa (2012, p.52), obtuvo una cantidad de cenizas totales de 2.35 % en *O. grandiflora* y Bonilla (2016, p.45), un valor de 4.88% en *P. manicata*, al igual que en el presente estudio se obtuvo un porcentaje que cumple con los criterios establecidos por la Farmacopea española del 2002, pues

la cantidad obtenida se debe a cenizas fisiológicas formadas por los minerales propios de las plantas (Moreno, Marín y Peña, 1999, pp.2-4).

### 3.1.3 *Contenido de cenizas solubles en H<sub>2</sub>O y cenizas insolubles en HCl*

El contenido de cenizas solubles en H<sub>2</sub>O fue de 0.70 % y 0.73% y de cenizas insolubles en HCl de 0.05 % y 0.067 %, para *P. manicata* y *O. grandiflora* respectivamente. Esto indica que el contenido de este tipo de cenizas se encuentran dentro de los parámetros de calidad establecidos por la Real Farmacopea, demostrando así que las drogas vegetales no se encuentran contaminadas con este tipo de materia inorgánica, además se asegura su uso, sin tener ninguna interferencia en el proceso de la investigación

Guerrero (2013), Sisa (2012), Cajamarca (2016), Yanza (2017), Santamaría (2016) y Bonilla (2016) obtuvieron resultados similares, que cumplieron con las directrices de calidad establecidas por la Farmacopea Española, sin embargo Bonilla (2016, p.45), determinó en *P. manicata* una cantidad de cenizas insolubles en HCl (0.98 %), que se encontraban en el límite de calidad establecido (1%); este contenido puede estar vinculado a materiales silíceos en la droga vegetal, tales como tierra o arena (Moreno, Marín y Peña, 1999, pp.2-6). LA ZONA DE RECOLECCION,

## 3.2. **Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico consiste en un conjunto de pruebas realizadas sobre extractos de polaridad creciente, que determinan la presencia de metabolitos secundarios en las drogas vegetales, y se basa principalmente en reacciones colorimétricas y de precipitación. Los resultados obtenidos se detallan desde la tabla 3-3 hasta la 8-3.

### 3.2.1 *Extracto etéreo*

**Tabla 3-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de las hojas de *P. manicata*.

Prueba fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto etéreo
Aceites y Grasas	Sudan	++
Alcaloides	Dragendorff	-
Alcaloides	Mayer	-
Alcaloides	Wagner	-
Lactonas y coumarinas	Baljet	+
Triterpenos y esteroides	Lieberman Buchard	++ (verde oscuro)

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 4-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de las hojas de *O. grandiflora*.

Prueba fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto etéreo
Aceites y Grasas	Sudán	+
Alcaloides	Dragendorff	-
Alcaloides	Mayer	-
Alcaloides	Wagner	-
Lactonas y coumarinas	Baljet	+
Triterpenos y esteroides	Lieberman Buchard	++ (verde oscuro)

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Después de realizar los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner, hubo ausencia de alcaloides en las hojas de las dos especies vegetales. En las dos especies hubo presencia de aceites, grasas, lactonas, coumarinas, triterpenos y esteroides.

No obstante, en el estudio realizado por Yanza (2017, p.59), sobre *O. grandiflora* no se encontró ningún metabolito en este extracto, esto se debe a que la planta se recolectó en la provincia de Loja a 1451 m s.n.m, mientras que la planta usada en este estudio se recolectó en la provincia de Chimborazo a 2833 m s.n.m., pues a mayor altura existe mayor presencia de metabolitos secundarios. Por otra parte, Santamaría (2016, p.59) determino una composición similar de metabolitos en *P. manicata*, con la única diferencia de que no se encontró lactonas y coumarinas.

### 3.2.2 Extracto alcohólico

**Tabla 5-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas de *P. manicata*.

Prueba fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto alcohólico
Alcaloides	Dragendorff	-
Alcaloides	Mayer	-
Alcaloides	Wagner	-
Lactonas y coumarinas	Baljet	++
Triterpenos y esteroides	Lieberman Buchard	++(verde oscuro)
Catequinas	Catequinas	-
Resinas	Resinas	-
Azúcares reductores	Fehling	+++ (precipitado rojo)
Saponinas	Espuma	-
Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	+++ (verde intenso)
Quinonas	Borntreger	-
Flavonoides	Shinoda	+++ (coloración roja)
Flavonoides	Antocianidinas	+++ (coloración roja)

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 6-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas de *O. grandiflora*.

Prueba fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto alcohólico
Alcaloides	Dragendorff	-
Alcaloides	Mayer	-
Alcaloides	Wagner	-
Lactonas y coumarinas	Baljet	+++
Triterpenos y esteroides	Lieberman Buchard	++ (verde oscuro)
Catequinas	Catequinas	+
Resinas	Resinas	-
Azúcares reductores	Fehling	+++ (precipitado rojo)
Saponinas	Espuma	++
Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	+++ (verde intenso)
Quinonas	Borntreger	+++ (coloración roja)
Flavonoides	Shinoda	+++ (coloración roja)
Flavonoides	Antocianidinas	+++ (coloración roja)

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Las dos especies vegetales reflejaron presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, azúcares reductores y ausencia de alcaloides. En *P. manicata* hubo ausencia de catequinas, resinas, saponinas, quinonas y en *O. grandiflora* tan solo de resinas.

Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas por Santamaría (2016) , Yanza (2017) y Sisa (2012), pero difieren con los resultados determinados por Guerrero (2013) en *O. grandiflora*, donde hubo presencia de todos estos metabolitos, a pesar de que no se especifica el lugar ni la altura de recolección de la planta, estos factores debieron haber jugaron un papel fundamental en la síntesis de estos compuestos.

### 3.2.3 *Extracto acuoso*

**Tabla 7-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de *P. manicata*.

Prueba fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto acuoso
Alcaloides	Dragendorff	-
Alcaloides	Mayer	-
Alcaloides	Wagner	-
Azúcares reductores	Fehling	+++ (precipitado rojo)
Saponinas	Espuma	+
Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	+++ (verde intenso)
Flavonoides	Shinoda	+++ (coloración naranja)
Mucílagos	Polisacáridos	-
Principios amargos y astringentes	Principios amargos y astringentes	++ (amargo y astringente)

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 8-3:** Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de *O. grandiflora*.

Prueba fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto acuoso
Alcaloides	Dragendorff	-
Alcaloides	Mayer	-
Alcaloides	Wagner	-
Azúcares reductores	Fehling	+++ (precipitado rojo)
Saponinas	Espuma	+++
Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	+++ (verde intenso)
Flavonoides	Shinoda	+++ (coloración roja)
Mucílagos	Polisacáridos	+ (consistencia gelatinosa)
Principios amargos y astringentes	Principios amargos y astringentes	++ astringente

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

En los extractos acuosos de las dos especies vegetales se identificó azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides y principios amargos, y nuevamente no se evidenció alcaloides. La presencia de saponinas, se debe a la alta polaridad del solvente que permite su extracción (Foy Valencia et al., 2005; Rondon et al., 2018).

Tan solo en *P. manicata* no se identificó mucilagos, pues la consistencia del extracto no cambió después de someterle a refrigeración, mientras que el de *O. grandiflora* se volvió gelatinoso. La existencia y ausencia de estos metabolitos es igual a los resultados reportados por Yanza (2017), Santamaría (2016) y Bonilla (2016).

### 3.3. Estandarización del extracto de *P. manicata* y *O. grandiflora*.

**Tabla 9-3:** Resultados del rendimiento y análisis organoléptico del extracto de *P. manicata*.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Olor	Herbáceo
Color	Marrón rojizo
Sabor	Ligeramente amargo y astringente
Rendimiento	25.52 %

**Realizado por:** Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 10-3:** Resultados del rendimiento y análisis organoléptico del extracto de *O. grandiflora*.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Olor	Herbáceo
Color	Verde oscuro
Sabor	Amargo y astringente
Rendimiento	30.24 %

**Realizado por:** Bryan Hidalgo, 2019.

Después de evaluar las características organolépticas de los extractos secos, se determinó que *P. manicata* posee un aroma herbáceo, un color marrón rojizo, y un sabor ligeramente amargo y astringente, mientras que el extracto seco de *O. grandiflora* es de un olor herbáceo, tiene un sabor amargo y astringente y un color verde oscuro.

Las características organolépticas dependen de los metabolitos secundarios contenidos en las plantas, la clorofila y ciertos pigmentos son los responsables del color de los extractos. El olor herbáceo se debe a compuestos volátiles de 6 carbonos, tales como hexanol, hexanal, cis-3-hexenal, entre otros. La astringencia y amargura se debe a la presencia de polifenoles, esto se



relaciona con la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos determinados en el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico (Sánchez et al., 2019, pp.1-9).

El rendimiento obtenido en *P. manicata* fue de 25.52 %, superando en gran medida al establecido por Santamaría (2016, p.48), cuyo rendimiento fue de 0.39%. El rendimiento pudo verse afectado por el método empleado, pues a partir del extracto etanólico concentrado se realizó extracciones sucesivas con hexano, cloroformo, acetato de etilo y etanol, evaluando en este último el rendimiento. Además el secado de la droga vegetal se efectuó a temperatura ambiente y no en una estufa, produciéndose un secado más lento que pudo haber dado lugar a la degradación de metabolitos por acción enzimática.

En esta investigación se obtuvo un rendimiento de 30.24% para *O. grandiflora*, mientras que en el estudio desarrollado por Cajamarca (2016, p.62), se logró un rendimiento de 21.59%, sin embargo no existe una diferencia significativa como el caso anterior, ya que el método de obtención del extracto fue similar, considerando que no hubo extracciones sucesivas a partir de un extracto inicial.

#### **3.4. Determinación de fenoles totales**

La determinación de fenoles totales de las dos especies vegetales se efectuó mediante un método espectrofotométrico, que se basa en una reacción colorimétrica de óxido reducción, donde el agente oxidante es el reactivo de Folin-Ciocalteu.

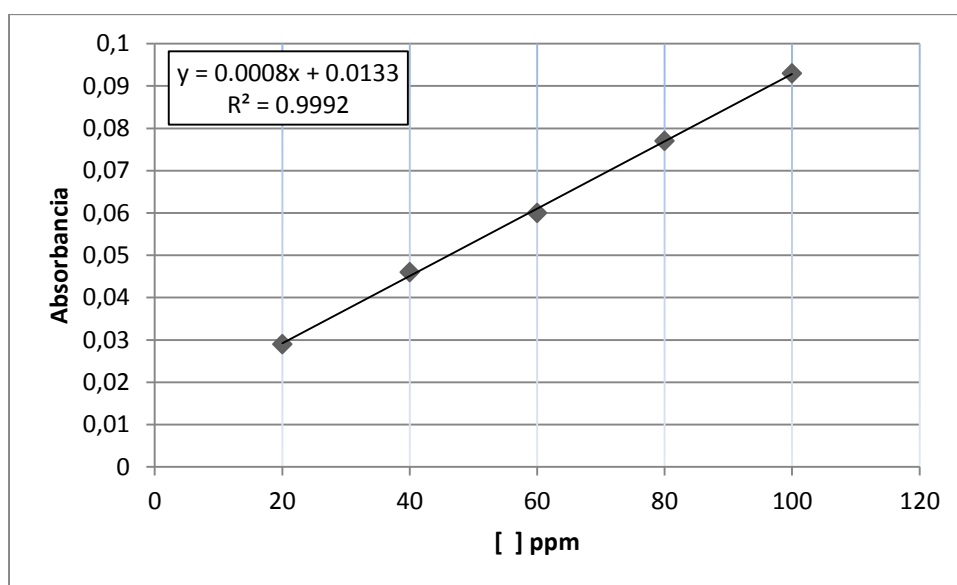
Para determinar el contenido de fenoles se elaboró una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar, a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, como se observa en la tabla 11-3 y en el gráfico 1-3.

Se obtuvo una ecuación de la recta de  $y = 0.0008x + 0.0133$ , con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.9992$  que indica una buena correlación entre las variables. Las muestras y los estándares se evaluaron por triplicado.

**Tabla 11-3:** Resultados de las absorbancias del estándar de ácido gálico.

[ ] ppm	Absorbancia
20	0.029
40	0.046
60	0.060
80	0.077
100	0.093

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.



**Gráfico 1-3:** Curva de calibración de las absorbancias del estándar de ácido gálico.

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

La concentración de fenoles totales de las especies vegetales se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto seco (mg EAG/g extracto seco), así como también en porcentaje, que es proporcional a los gramos de equivalentes de ácido gálico que hay en 100 gramos de extracto seco.

**Tabla 12-3:** Resultados del contenido de fenoles totales del extracto seco de *P. manicata*.

Sustancia	mg EAG /g extracto seco	Porcentaje (%)
Extracto seco	240 ± 10	24 ± 1

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 13-3:** Resultados del contenido de fenoles totales del extracto seco de *O. grandiflora*.

Sustancia	mg EAG /g extracto seco	Porcentaje (%)
Extracto seco	208.33 ± 12.58	20.83 ± 1.26

**Realizado por:** Bryan Hidalgo, 2019.

La cantidad de fenoles totales determinados en el extracto de *P. manicata* fue de  $240 \pm 10$  mg EAG/g de extracto seco, correspondiente al  $24 \pm 1\%$ , y de *O. grandiflora* fue de  $208.33 \pm 12.58$  mg EAG/g de extracto seco, correspondiente al  $20.83 \pm 1.26 \%$ . Estos compuestos son responsables de la capacidad fotoprotectora, y podrían estar relacionados en cierta medida con la actividad irritativa y genotóxica, sin embargo las pruebas *in vitro* realizadas corroboraron que no poseen éstas actividades.

Los resultados reflejaron que las dos especies vegetales poseen una cantidad considerable de fenoles totales, pues el porcentaje de fenoles totales de este estudio, fue mayor al reportado en la investigación de *P. manicata* realizada por Santamaría (2016, p.61), donde se determinó un porcentaje de  $14.21 \pm 0.19$  y al de *O. grandiflora* determinado en el estudio de Yanza (2017, p.59), donde se obtuvo un valor de  $16.004 \pm 0.296 \%$ .

Estas diferencias pueden deberse a factores ambientales a los que están expuestos las especies vegetales, tales como la altitud, temperatura e incluso insectos que podrían atacarlas. Cuando las condiciones son hostiles las plantas producen más metabolitos para adaptarse ; por ejemplo a mayor altura existe más radiación solar, las plantas para protegerse producen mayor cantidad de fenoles y flavonoides (Vega, De León y Reyes, 2017, p.7).

### 3.5. Determinación de flavonoides totales

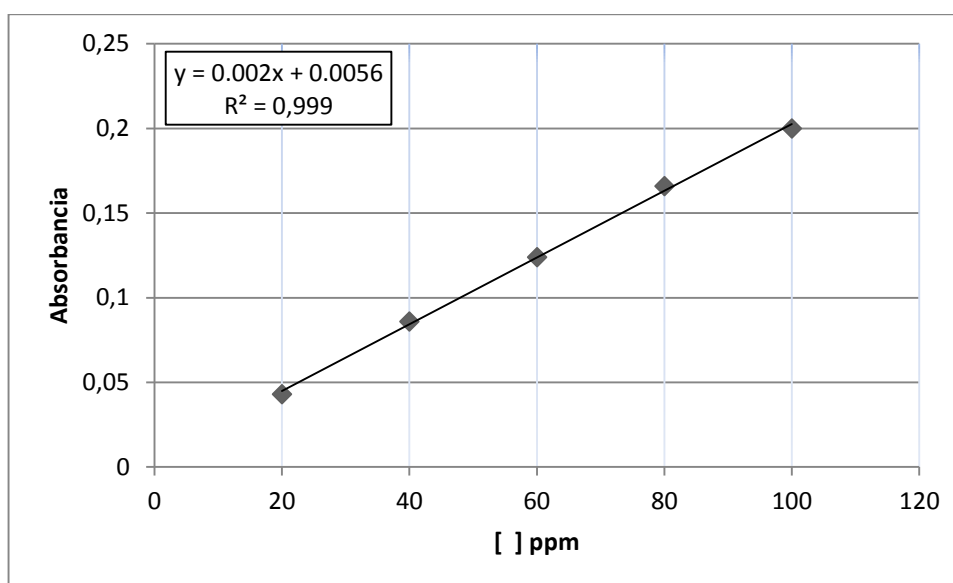
La determinación de flavonoides totales de las dos plantas se realizó a través de un método espectrofotométrico basado en la formación de un complejo entre los flavonoides y el tricloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ), donde la solución se torna rosada después de la reacción.

Se elaboró una curva de calibración para determinar el contenido de flavonoides totales, empleando quercetina como patrón, a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, como se observa en la tabla 14-3 y en el gráfico 2-3. La ecuación de la recta obtenida fue de  $y = 0.002x + 0.0056$ , con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.999$  que indica una buena correlación entre las variables.

**Tabla 14-3:** Resultados de las absorbancias del estándar de quercetina

[ ] ppm	Absorbancia
20	0.043
40	0.086
60	0.124
80	0.166
100	0.200

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.



**Gráfico 2-3:** Curva de calibración de las absorbancias del estándar de quercetina.

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

La concentración de fenoles totales de las especies vegetales y de los patrones se determinó por triplicado y los valores obtenidos se expresaron como mg de equivalentes de quercetina por gramos de extracto (mg EQ/g extracto seco), y en gramos de equivalentes de quercetina por 100 gramos de extracto, que equivaldría al porcentaje de flavonoides. Los resultados de la cantidad de flavonoides totales de las especies vegetales se plasmaron en las tablas 13-3 y 14-3.

**Tabla 15-3:** Resultados del contenido de flavonoides totales del extracto seco de *P. manicata*.

Sustancia	mg EQ /g extracto seco	Porcentaje (%)
Extracto seco	259.68 ± 3.97	25.97 ± 0.37

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 16-3:** Resultados del contenido de flavonoides totales del extracto seco de *O. grandiflora*.

Sustancia	mg EQ /g extracto seco	Porcentaje (%)
Extracto seco	286.29 ± 7.39	28.63 ± 0.74

**Realizado por:** Bryan Hidalgo, 2019.

Se encontró que los extractos hidroalcohólicos de *P. manicata* y *O. grandiflora* contienen 259.68 ± 3.97 mg EQ/g de extracto seco (25.97 ± 0.37 %) y 286.29 ± 7.39 mg EQ/g de extracto seco (28.63 ± 0.74 %), respectivamente.

De acuerdo con la investigación efectuada por Cajamarca (2016) y Vinueza et al., (2018) los flavonoides más abundantes en *O. grandiflora* son la rutina (quercetina 3-o-rutinósido), narcisina (isoramnetina 3-O-rutinósido), quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido, quercetina 3-O-β-glucurónido y miricetina 3-O-β-glucurónido. Por otro lado, en la investigación efectuada por Da Silva Morrone et al., (2013, p.4), determinaron que los flavonoides en *P. manicata* están representados por vitexina (apigenina-8-C-glucósido), isovitexina (apigenina-6-C-glucósido) e isoorientina (luteolina-6-C-glucósido).

Estos flavonoides glucosilados son los responsables de la actividad fotoprotectora, cuyos beneficios serán aprovechados por investigaciones posteriores en la elaboración de fotoprotectoras solares. Además se determinó que son inocuos ya que después de realizar el ensayo HET-CAM, CAM-TBS y el test de micronúcleos, no hubo signos de irritación ocular ni presencia de micronúcleos.

Como en el caso de los fenoles, los factores ambientes a los que están expuestas las plantas condicionaron a que sintetizen sus metabolitos secundarios, tal es el caso de la investigación realizada por Cajamarca (2016, p.74), donde se recolectó la planta en la región de Colta a 3500 m s.n.m y se encontró que la especie *O. grandiflora* contiene un porcentaje de flavonoides de 53.55 ± 13.23, superando al obtenido en el presente estudio, pues la recolección se hizo a menor altura, aproximadamente a 2833 m s.n.m.

En la investigación realizada por Bonilla (2016, p.56), se encontró que el porcentaje de flavonoides de *P. manicata* de 5.3101 ± 0.1004 es menor al determinado en este estudio, debido a que fue recolectada en Pallatanga que es un lugar de menor altura y por ende más cálido.

### 3.6. Determinación de la irritación ocular por el método *in vitro* HET-CAM.

La determinación de la irritación ocular a través de este método cualitativo se basó en la evaluación visual de los signos de la inflamación, después de aplicar la sustancia sobre la membrana corioalantoidea de un huevo de gallina. El tiempo de aparición de hemorragia, lisis y coagulación se mide en segundos, para luego clasificar a las sustancias según un puntaje de irritación. Los puntajes de irritación obtenidos de los extractos y de los controles se evidencian en la tabla 17-3 y 18-3.

**Tabla 17-3:** Resultados del test HET-CAM de *Passiflora manicata*.

Concentración del extracto ( ppm)	Puntaje de irritación	Clasificación
200	0	No irritante
500	0	No irritante
1000	0	No irritante
3000	0	No irritante
Control Positivo (NaOH 0.1 M)	16.957 ± 0.502	Irritante severo
Control negativo (Suero fisiológico)	0	No irritante

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 18-3:** Resultados del test HET-CAM de *Oreocallis grandiflora*.

Concentración del extracto ( ppm)	Puntaje de irritación	Clasificación
200	0	No irritante
500	0	No irritante
1000	0	No irritante
3000	0	No irritante
Control Positivo (NaOH 0.1 M)	16.957 ± 0.502	Irritante severo
Control negativo (Suero fisiológico)	0	No irritante

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Los resultados obtenidos de *P. manicata* y *O. grandiflora* mostraron un puntaje de irritación de cero en todas las concentraciones de los extractos al igual que el control negativo. El valor resultante permite clasificarlos como sustancias no irritantes de acuerdo a Debbasch et al., (2005, p.2), pues transcurridos los 5 minutos de la evaluación visual no se verificó ningún signo de inflamación.

Como control positivo se utilizó NaOH, que al ser aplicado sobre la membrana corioalantoidea, inició una serie de eventos como hemorragia aproximadamente a los 20 segundos (enrojecimiento marcado alrededor de los vasos sanguíneos), lisis a los 40 segundos (ruptura de los vasos sanguíneos y salida de sangre) y coagulación a los 114 segundos (formación de una

especie de grumos en forma de coliflor). Después de realizar los cálculos correspondientes se evidenció un puntaje de  $16.957 \pm 0.502$ , que de acuerdo a Debbasch et al., (2005, p.2), se clasifica como irritante severo. El NaOH es conocido por causar lesiones en los ojos, las membranas mucosas y la piel, incluso a bajas concentraciones (Quiminet, 2008).

### 3.7. Determinación de la irritación ocular por el método CAM-TBS.

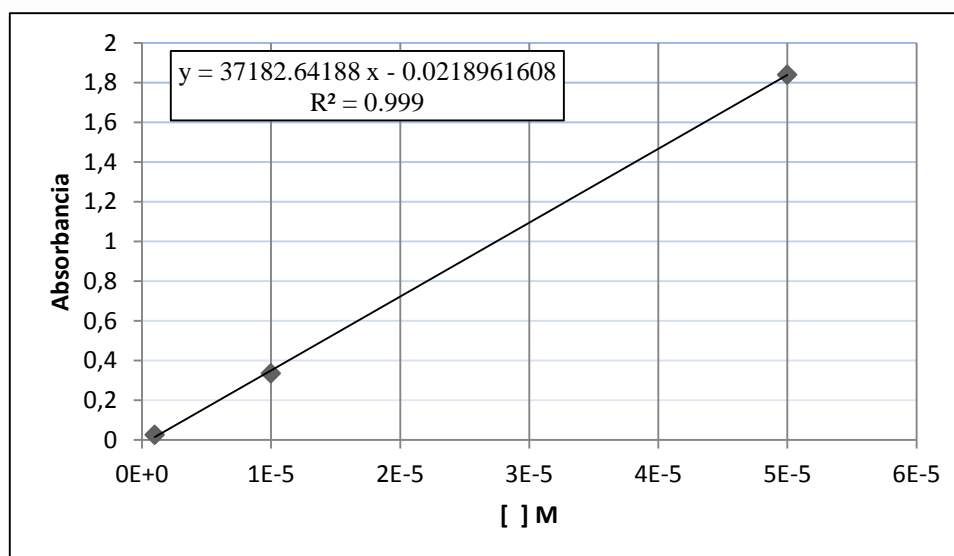
El test CAM-TBS es un método cuantitativo basado en la medición de la cantidad de azul tripán absorbido por la membrana corioalantoidea, después de ser aplicada una sustancia. El colorante tiene la capacidad para adherirse a las membranas biológicas dañadas, por lo que es un indicador fiable de daño. Los resultados emitidos con este test tienen buena correlación con los obtenidos en el test de Draize (Liebsch y Spielmann, 2002, p.6).

Para calcular la cantidad de colorante absorbido se construyó una curva de calibración mediante la disolución de azul tripán en dimetil formamida, a concentraciones de  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  y  $5 \times 10^{-5}$ M, donde se obtuvo una ecuación de la recta de  $y = 37182.64188 x - 0.0218961608$ , con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0.999$ , como se observa en la tabla 19-3 y en el gráfico 3-3.

**Tabla 19-3:** Resultados de las absorbancias del colorante azul tripán.

[ M ]	Absorbancia
$10^{-6}$	0.027
$10^{-5}$	0.336
$5 \times 10^{-5}$	1.840

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.



**Gráfico 3-3:** Curva de calibración del colorante azul tripán en dimetil formamida.

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 20-3:** Resultados del test CAM-TBS de *Passiflora manicata*.

Concentración del extracto ( ppm)	Concentración de colorante absorbido (nmoles/mg)	Clasificación
200	0.045 ± 0.0018	No irritante
500	0.048 ± 0.0028	No irritante
1000	0.060 ± 0.0040	No irritante
3000	0.075 ± 0.0017	No irritante
Control Positivo (NaOH 0.1 M)	0.188 ± 0.0056	Irritante severo
Control negativo (Suero fisiológico)	0.038 ± 0.0022	No irritante

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 21-3:** Resultados del test CAM-TBS de *Oreocallis grandiflora*

Concentración del extracto ( ppm)	Concentración de colorante absorbido (nmoles/mg)	Clasificación
200	0.058 ± 0.0042	No irritante
500	0.066 ± 0.0081	No irritante
1000	0.082 ± 0.0033	No irritante
3000	0.086 ± 0.0037	No irritante
Control Positivo (NaOH 0.1 M)	0.188 ± 0.0056	Irritante severo
Control negativo (Suero fisiológico)	0.038 ± 0.0022	No irritante

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Los resultados obtenidos de *P. manicata* y *O. grandiflora* se encuentran en la tabla 20-3 y 21-3, demostrando que los extractos a 200, 500, 100 y 3000 ppm se clasifican como no irritantes, ya que se obtuvo concentraciones de colorante ( $0.058 \pm 0.0042$  y  $0.086 \pm 0.0037$  nmoles/mg) por debajo de 0.1 nmoles/mg de membrana (García et al., 2004, p.3).

Se utilizó como control negativo solución salina al 0.9 %, reflejando un valor de  $0.038 \pm 0.0022$ , que se clasificó como no irritante, ya que es una sustancia isotónica que permite la homeostasis de las estructuras biológicas. El NaOH 0.1M presentó un valor promedio de  $0.188 \pm 0.0056$  nmoles/mg de membrana, alcanzando una clasificación de irritante severo. Cada una de las denominaciones se basa en la concentración de colorante absorbido mayor o igual a 0.150 nmoles/mg de membrana (García et al., 2004, p.3).

No existen estudios acerca del potencial irritativo de *P. manicata* ni *O. grandiflora*. Sin embargo, Churampi y Montes (2015, p.48), estudiaron el potencial de irritación dérmica y ocular de *Passiflora mollissima* mediante el test *Irritation Assay System* y el método HET-CAM, encontrando que el extracto etanólico al 20 %, posee buen margen de seguridad preliminar, con tendencia a irritante, sin embargo esto es atribuible a la naturaleza de la solución etanólica más que a la acción propia de los componentes de la planta.



Investigaciones de especies de la misma familia (Proteaceae), como el de *Grevillea robusta* determinaron que contiene el alérgeno 5-tridecil resorcinol, causante de reacciones de hipersensibilidad al entrar en contacto con la piel. A pesar de ser un compuesto característico en esta especie, en *O. grandiflora* no se han identificado metabolitos que produzcan irritación en la piel o en membranas mucosas (Silva, 2010, p.8).

### 3.8. Determinación de la genotoxicidad en *Vicia faba* a través del test de MCNs

Para evaluar el potencial genotóxico de los extractos de *P. manicata* y *O. grandiflora* se empleó el test de micronúcleos en células de *vicia faba*, el cual se fundamenta en la capacidad de una sustancia para causar alteraciones en el ADN y en los componentes celulares que definen el comportamiento de los cromosomas en la división celular. Los resultados se expresan después de contar 1000 células de la región meristemática y F1, estos se evidencian en las siguientes tablas (Ma et al., 1995, pp.3-6).

**Tabla 22-3:** Resultados del test de micronúcleos de *Passiflora manicata*.

Concentración del extracto (%)	Índice mitótico (%)	Micronúcleos (%)
1	28.53 ± 3.15	0
0.4	27.50 ± 2.42	0
0.2	26.93 ± 2.65	0
0.1	26.80 ± 2.62	0
Control positivo (EtOH Absoluto)	2.37 ± 0.87	2.47 ± 0.59
Control negativo (H2O destilada)	26.63 ± 3.96	0

Realizado por: Hidalgo Bryan, 2019

**Tabla 23-3:** Resultados del test de micronúcleos de *Oreocallis grandiflora*.

Concentración del extracto (%)	Índice mitótico (%)	Micronúcleos (%)
1	27.93 ± 1.89	0
0.4	27.07 ± 2.30	0
0.2	26.80 ± 2.05	0
0.1	26.13 ± 1.22	0
Control positivo (EtOH Absoluto)	2.37 ± 0.87	2.47 ± 0.59
Control negativo (H2O destilada)	26.63 ± 3.96	0

Realizado por: Hidalgo Bryan, 2019

En las tablas 22-3 y 23-3 se muestran los resultados del índice mitótico y el índice de micronúcleos, obtenidos después de someter las radículas de *vicia faba* a los extractos de *P. manicata* y *O. grandiflora*, a concentraciones de 1, 0.4, 0.2 y 0.1 %.

Se encontró que los extractos de *P. manicata* poseen un índice mitótico entre  $26.80 \pm 2.62$  y  $28.53 \pm 3.15$  % y los extractos de *O. grandiflora* un valor entre  $26.13 \pm 1.22$  y  $27.93 \pm 1.89$  %, y a su vez las dos especies vegetales presentan un índice de micronúcleos de cero. Los resultados obtenidos no poseen diferencias significativas en comparación con el control negativo ( $26.63 \pm 3.96$  %), por lo que se puede afirmar que no alteran el material genético.

Por otro lado, para el control positivo se utilizó etanol absoluto, que sirvió como referencia para evaluar los resultados obtenidos, se obtuvo un valor de  $2.37 \pm 0.87$  % en el índice mitótico, y un valor promedio de  $2.47 \pm 0.59$  % en el índice de micronúcleos, esto corrobora su actividad antimitótica y genotóxica. En varias células se observó un pequeño núcleo cerca del núcleo principal, el etanol produce cambios cromosómicos alterando los procesos que dirigen el desplazamiento de los cromosomas en la división celular, quedando porciones o cromosomas enteros aislados de los núcleos principales. El Etanol se clasifica en el grupo 1 (carcinógeno humano) por la agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Kayani y Parry, 2010, p.1).

La actividad genotóxica de los flavonoides depende de sus características estructurales, la posición de los grupos OH condiciona esta actividad, estudios realizados por Do Céu Silva et al., (2003) ; El Hajjouji et al., (2007) y Martino (2000) encontraron que algunos flavonoides tienen actividad mutagénica *in vitro*, tal es el caso del kaempferol, la quercetina y otros derivados flavonoides que presentan grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B o en la posición 3 del anillo C. *P. manicata* y *O. grandiflora* no poseen flavonoides con grupos OH en la posición 3 ni en posición orto en el anillo B, pero si poseen flavonoides como los derivados de la quercetina, no obstante, el grupo OH en la posición 3 forma el enlace glucosídico.

Todos los flavonoides presentes en estas especies vegetales son glucosídicos, estudios realizados por Engen et al., (2015, pp.5-6), encontraron que los efectos genotóxicos y citotóxicos de los flavonoides disminuyen a medida que aumenta el número de azúcares. Los hidratos de carbono hacen que sean más hidrófilos, dificultando la absorción y biodisponibilidad, resultando en menor toxicidad. También encontraron que la ramnosa puede proporcionar resistencia celular a la genotoxicidad inducida por flavonoides, *O. grandiflora* posee un flavonoide (quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido) que tiene una ramnosa en su estructura.

No existen estudios de la actividad genotóxica de *O. grandiflora*, sin embargo, en una investigación realizada por Makhuele et al., (2018, p.9), se empleó los ensayos de microsoma de *Salmonella* y Vitotox para determinar el potencial genotóxico de extractos de plantas de la

misma familia (Proteaceae), encontrando que no son genotóxicas. Tampoco existen estudios de la genotoxicidad de *P. manicata*, no obstante, en un estudio realizado por Picada et al., (2009, p.9), se evaluó la genotoxicidad de alcaloides B-carbolina (harman y harmina) conocidos por interactuar con el ADN, y que están presentes en la familia Passifloraceae, encontrándose que no inducen la formación de micronúcleos en células de medula ósea de ratones. Estas investigaciones también corroboran la inocuidad de los extractos de las dos especies vegetales.

### 3.7.1 *Análisis estadístico de la genotoxicidad mediante el test de MCNs en Vicia faba*

Para determinar la relación del control positivo con los extractos de una forma más objetiva se realizó un análisis estadístico mediante el programa IBM-SPSS. Realizando pruebas estadísticas que permitieron determinar la normalidad de los datos, la homogeneidad de las varianzas de los grupos experimentales, la relación o independencia de los extractos con el control negativo y la asociación entre variables. Los resultados de las diferentes pruebas realizadas se muestran en las siguientes tablas.

#### 3.7.1.1 *Índice mitótico*

**Tabla 24-3:** Test de normalidad de Shapiro Wilk para *P. manicata*.

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Valor de p
1 %	0.966	3	0.648
0.4 %	0.980	3	0.726
0.2 %	0.926	3	0.473
0.1 %	0.947	3	0.554
Control positivo (EtOH absoluto)	0.947	3	0.554
Control negativo (H2O destilada)	0.782	3	0.072

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 25-3:** Test de normalidad de Shapiro Wilk para *O. grandiflora*.

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Valor de p
1 %	0.855	3	0.253
0.4 %	0.955	3	0.590
0.2 %	0.998	3	0.919
0.1 %	0.964	3	0.637
Control positivo (EtOH absoluto)	0.947	3	0.554
Control negativo (H2O destilada)	0.782	3	0.072

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Los valores de p del test de normalidad de Shapiro Wilk para todas las concentraciones y los controles, son mayores al nivel de significancia (0.05), esto demuestra que los datos analizados del índice mitótico de *P. manicata* y *O. grandiflora* son normales.

**Tabla 26-3:** Estadístico de Levene de *P. manicata*.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	valor de p
1.418	5	12	0.286

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 27-3:** Estadístico de Levene de *O. grandiflora*.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	valor de p
2.569	5	12	0.084

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

En ambas evaluaciones el valor de p del estadístico de Levene es mayor al nivel de significancia (0.05), esto demuestra que las varianzas de los grupos experimentales de cada concentración son homogéneas.

**Tabla 28-1:** Test de ANOVA de un factor para *P. manicata*.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F <sub>CAL</sub>	F <sub>0.05</sub>
Entre grupos	1558.849	5	311.770	40.539	3.106
Dentro de grupos	92.287	12	7.691		
Total	1651.136	17			

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 29-3:** Test de ANOVA de un factor para *O. grandiflora*.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F <sub>CAL</sub>	F <sub>0.05</sub>
Entre grupos	1511.638	5	302.328	58.484	3.106
Dentro de grupos	62.033	12	5.169		
Total	1573.671	17			

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Como el F<sub>CAL</sub> de *P. manicata* (40.539) y *O. grandiflora* (58.584) es mayor al F<sub>0.05</sub> (3.106), se deduce que hay diferencias significativas de las medias del índice mitótico del control positivo entre las medias de los extractos y control negativo, por lo tanto se acepta  $H_1$  (Los extractos no inhiben la mitosis) y se rechaza la  $H_0$  (Los extractos inhiben la mitosis) con el 95% de certeza y el 5% de error.

**Tabla 30-3:** Test de Tukey de *P. manicata*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		Grupo 1	Grupo 2
Control positivo (EtOH absoluto)	3	2.3667	
Control negativo (H2O destilada)	3		26.6333
0.1 %	3		26.8000
0.2 %	3		26.9333
0.4 %	3		27.5000
1 %	3		28.5333
Sig.		1.000	0.954

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

**Tabla 31-3:** Test de Tukey de *O. grandiflora*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		Grupo 1	Grupo 2
Control positivo (EtOH absoluto)	3	2.3667	
0.1 %	3		26.1333
Control negativo (H2O destilada)	3		26.6333
0.2 %	3		26.8000
0.4 %	3		27.0667
1 %	3		27.9333
Sig.		1.000	0.919

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

El test de Tukey muestra que no existen diferencias significativas entre las medias del índice mitótico del control negativo y las concentraciones de los extractos, ya que se encuentran dentro del mismo grupo (grupo 2), mientras que el control positivo al encontrarse en el grupo 1 tiene diferencias significativas entre el control negativo y los extractos. La independencia frente al control negativo demuestra que los extractos no inhiben la mitosis.

### 3.7.1.2 Índice de micronúcleos

**Tabla 32-3:** Test de normalidad de K-S para el índice de MCNs de *P. manicata* y *O. grandiflora*.

		Índice de micronúcleos
N		18
Parámetros normales	Media	0.4111
	Desviación Std.	0.96704
Las diferencias mas extremas	Absoluto	0.498
	Positivo	0.498
	Negativo	-0.335
Prueba estadística		0.498
Valor de p		0.000

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Para evaluar la normalidad de los datos se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) en lugar de Shapiro-Wilk, ya que los valores de cero al ser reconocidos como una constante, fueron omitidos por el programa estadístico. De acuerdo al test K-S el valor de p es menor al nivel de significancia (0.05), demostrando que los datos analizados del índice de micronúcleos de *P. manicata* y *O. grandiflora* no son normales, siendo necesario el empleo de un test no paramétrico como el Chi-Cuadrado.

**Tabla 33-3:** Test de Chi-Cuadrado para para el Índice de MCNs de *P. manicata* y *O. grandiflora*.

	Valor	gl	Valor de p
Chi-Cuadrado de Pearson	18.000	15	0.263
Relación de verosimilitud	16.220	15	0.368
Asociación lineal por lineal	2.510	1	0.113
N de casos válidos	18		

Realizado por: Bryan Hidalgo, 2019.

Mediante el test de Chi-Cuadrado se pudo inferir que los extractos no son genotóxicos, ya que en la evaluación del índice de micronúcleos se obtuvo un valor de p (0.263) mayor al nivel de significancia (0.05), demostrando que el índice de micronúcleos del control positivo es independiente al índice de los extractos y control negativo.

## CONCLUSIONES

1. Mediante el uso de las prueba de genotoxicidad, HET-CAM y CAM-TBS se determinó que los extractos de *P. manicata* y *O. grandiflora* a un amplio rango de concentraciones son seguros para ser aplicados en protectores solares, los cuales podrán ser utilizados por la población sin que se produzcan efectos adversos. Además, se demostró que a través de pruebas *in vitro* es factible obtener resultados de una forma más bioética, evitando el uso de animales de experimentación como los conejos en la prueba de Draize, y ratones en el ensayo de genotoxicidad.
2. Los extractos hidroalcohólicos de *Passiflora manicata* y *Oreocallis grandiflora* a 1, 0.4, 0.2 y 0.1 % no presentaron ninguna actividad genotóxica, ya que no causaron inhibición de los procesos mitóticos, ni presencia de micronúcleos, no hubieron diferencias significativas en comparación con el control negativo. Además se utilizó pruebas estadísticas para evaluar los resultados, observando la independencia de los extractos frente al control positivo. Por lo tanto, los extractos son seguros y al incluirse en protectores solares no causarán alteraciones en el ADN de las células epiteliales, ni en los procesos que rigen el desplazamiento de los cromosomas en la mitosis.
3. A través de la prueba de irritación ocular por el método de la membrana corioalantoidea de huevo de gallina (HET-CAM) se pudo determinar en forma cualitativa que los extractos de *Oreocallis grandiflora* y *Passiflora manicata* no causan irritación de la piel ni de las membranas mucosas. Después de aplicar los extractos a 200, 500, 1000 y 3000 ppm, no se observó signos de inflamación en los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea. Esto fue comparable con el control positivo que en pocos segundos si causó hemorragia, lisis y coagulación.
4. El ensayo CAM-TBS permitió determinar en forma cuantitativa que todas las concentraciones de los extractos de las dos especies vegetales no poseen actividad irritante, se obtuvo valores de irritación que estaban por debajo de los puntajes para ser considerados como irritantes moderados o severos. Mediante este ensayo se corroboró nuevamente que los extractos de las dos plantas son completamente seguros para formar parte de protectores solares, estos podrán ser aplicados en la piel y cerca de la membrana mucosa ocular sin causar daños.



## RECOMENDACIONES

1. Para la preparación de estándares y muestras se debe lavar los materiales con una solución sulfocrómica, para eliminar todas las trazas de materia orgánica y evitar interferencias en la obtención de los resultados.
2. En los ensayos de irritación ocular utilizar huevos de no más de 5 días, para asegurar un óptimo desarrollo de la membrana corioalantoidea y así reducir al máximo el descarte de huevos defectuosos o no viables.
3. En el ensayo de HET-CAM y CAM-TBS humedecer con solución salina al 0.9% la membrana blanquecina que protege la membrana corioalantoidea, para facilitar su extracción y evitar que se adhiera y lacere los vasos sanguíneos en el momento de su desprendimiento.
4. En el ensayo de genotoxicidad, tomar en cuenta la metodología de tinción de las radículas con Orceína, de manera que al observarse en el microscopio no haya superposición del tejido vegetal y haya una óptima visualización de las fases de la mitosis y los micronúcleos.
5. Se recomienda evaluar la capacidad irritativa de los extractos de *Passiflora manicata* y *Oreocallis grandiflora* mediante el modelo RBC (red blood cells), para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos HET-CAM y CAM-TBS, de manera que haya mayor fiabilidad de su incorporación en protectores solares.

## BIBLIOGRAFÍA

**Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Tobar, V., Witte, P. De y Leuven, U.** “Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal”. *Revista Tecnológica ESPOL* [en línea], 2010, (Ecuador) vol. 23, no. 1, pp. 89-97. ISSN 1390-3659. Disponible en: [http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/40/12%5Cnfile:///C:/Users/Sony-PC/Desktop/Cursos 2013/Curso escritura articulo/Revision bibliografica/Para el art/Estudio preliminar de plantas medicinales utilizadas Azuay, Ca?a y Loja.pdf%5C](http://www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/40/12%5Cnfile:///C:/Users/Sony-PC/Desktop/Cursos%202013/Curso%20escritura%20articulo/Revision%20bibliografica/Para%20el%20art/Estudio%20preliminar%20de%20plantas%20medicinales%20utilizadas%20Azuay,%20Ca%C3%B1ar%20y%20Loja.pdf%5C).

**Bonilla, A.B.** Estudio Fitoquímico y actividad antioxidante *in vitro* de hojas y flores de *Passiflora manicata* [en línea] (Tesis) (pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 56-57. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: [http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5021/1/56T00636 UDCTFC.pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5021/1/56T00636%20UDCTFC.pdf).

**Bravo-Velásquez, E.** La biodiversidad en el Ecuador. Universidad Pontificia Salesiana, 2014, Ecuador. Editorial Universitaria Abya-Yala. vol. 1. ISBN 9780874216561.

**Bravo, D.** “Evaluación toxicológica aguda de los extractos etanólicos de hojas de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* sobre *Rattus norvegicus* por vía oral” [en línea] (Tesis) (pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 68-69. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7858/1/236T0290.pdf>.

**Bruneton, J.,** 1993. Fitoquímica de Plantas Medicinales. 2da ed.España: Achibia. S.A, 1993, pp. 1082.

**Cajamarca, D.S.** “Determinación de la actividad fotoprotectora *in vitro* de los extractos de *Oreocallis grandiflora*. Facultad de Ciencias” [en línea] (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. p.98. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6331/1/56T00674.PDF>.

**Cerón Martínez, C.E.** “Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos”. *Botánica Económica de los Andes Centrales* [en línea], 2006, (Ecuador) vol.1, no.1, pp. 285-293. Disponible en:

c:%5CUsers%5CUusuario%5CDocuments%5CBibliografia Etnobotanica%5CCer?n Mart?nez.  
2006.Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos.pdf.

**Checa, Ó., Rosero, E. y Eraso, I.** “Colección y caracterización morfoagronómica del subgénero *Tacsonia* en la zona andina del departamento de Nariño, Colombia”. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 2011, (Colombia) vol. 64, no. 1, pp. 1-17.

**Churampi, L. D.R. Y Montes, E.E.** Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.bailey «tumbo serrano» y su uso como biológico en industria cosmética. [en línea], (Tesis) (Pregrado) Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú. 2015, p.48. [Consulta: 2019-01-04] Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4362/1/Churampi\\_II.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4362/1/Churampi_II.pdf).

**Da Silva Morrone, M., De Assis, A.M., Da Rocha, R.F., Gasparotto, J., Gazola, A.C., Costa, G.M., Zucolotto, S.M., Castellanos, L.H., Ramos, F.A., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H., Gelain, D.P. y Moreira, J.C.F.** “*Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models”. *Food and Chemical Toxicology* [en línea], 2013, (Brasil) vol. 60, pp. 45-51. ISSN 02786915. DOI 10.1016/j.fct.2013.07.028. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.028>.

**Debbasch, C., Ebenhahn, C., Dami, N., Pericoi, M., Van Den Berghe, C., Cottin, M. Y Nohynek, G.J.** “Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: Correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition”. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, (Francia) vol. 43, no. 1, pp. 155-165. ISSN 02786915. DOI 10.1016/j.fct.2004.09.004.

**Do Céu Silva, M., Gaspar, J., Silva, I.D., Leão, D. y Rueff, J.** “Induction of chromosomal aberrations by phenolic compounds: Possible role of reactive oxygen species”. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2003, (Brasil) vol. 540, no. 1, pp. 29-42. ISSN 13835718. DOI 10.1016/S1383-5718(03)00168-2.

**ECOGRANS**, *Características de la Haba*. [en línea]. Ecuador: 2017 [Consulta: 2 enero 2019]. Disponible en: <https://ecograins.wordpress.com/2014/04/29/caracteristicas-tecnicas-de-la-haba/>.

**El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guiresse, M., Merlina, G., Revel, J.C. y Hafidi, M.** “Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test”.

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007, (Francia) vol. 634, no. 1-2, pp. 25-31. ISSN 13835718. DOI 10.1016/j.mrgentox.2007.05.015.

**Engen, A., Maeda, J., Wozniak, D.E., Brents, C.A., Bell, J.J., Uesaka, M., Aizawa, y . Y Kato, T.A.** “Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides”. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [en línea], 2015, (Japón) vol. 784-785, pp. 15-22. ISSN 18793592. DOI 10.1016/j.mrgentox.2015.04.007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.007>.

**Espinoza, M.** Aislamiento biodirigido (*in vitro*) de sustancias antioxidantes y antihiper glucemiantes a partir de *Oreocallis grandiflora* (Cucharillo). [en línea], 2010, (Tesis) (pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador. 2010. p. 20 [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1858/3/UTPL\\_Alejandro\\_Espinosa\\_Mónica\\_Haideé\\_1001575.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1858/3/UTPL_Alejandro_Espinosa_Mónica_Haideé_1001575.pdf).

**Esquerre, B.P.** “Taxonomía, morfología y anatomía peciolar de las Passifloraceae de la región Lambayeque y zonas adyacentes”. [en línea]. (Tesis). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú. 2014. p.22. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/298>.

**Páez, E.** *¿Es justificable la experimentación animal?* [en línea]. España: Eze Páez, 2017 [Consulta: 2 enero 2019]. Disponible en: [https://www.eldiario.es/caballodenietzsche/justificable-experimentacion-animal\\_6\\_602699753.html](https://www.eldiario.es/caballodenietzsche/justificable-experimentacion-animal_6_602699753.html).

**Fina, B.L., Lombarte, M. y Rigalli, A.** Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios *in vivo*, *in vitro* o *in silico*? *Actualizaciones en Osteología*, 2013, (Argentina) vol. 9, no. 3, pp. 294-299. ISSN 16698975.

**Foy Valencia, E., Donald, D. Mac, Cuyos, M. y Dueñas, R.** “Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*”. *Biotempo* [en línea], 2005, (Peru) vol. 5, pp. 31-36. Disponible en: <http://v-beta.urp.edu.pe/pdf/id/2225/n/descargar>.

**Gabino Garrido\* y Macarena Ortiz, P.P.** “Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. Total phenols and flavonoids and antioxidant

activity of *Lampaya medicinalis* F. Phil. leaf extracts". *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* [en línea], 2013, (Chile) vol. 1 num., no. 1, pp. 30-38. ISSN 0719-4250. DOI <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD012893>. Disponible en: <http://jppres.com/jppres>.

**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, (España) pp. 103-107. ISSN 02127113. Disponible en: <http://www.ojs.easyapps.es/index.php/revtoxicol/article/view/214>.

**Gracia, M.** "Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales". *Revista Universidad Autónoma de Querétaro*, 2009, (México) pp. 1-4. ISSN 03788741. DOI 10.1590/S0102-695X2010000200015.

**Guerrero, D.** Actividad hipoglucemiante del extracto de las hojas de *Oreocallis grandiflora* en ratas (*Rattus norvegicus*) por inhibición de alfa-amilasa. [en línea]. (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2013. p. 65. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3428/1/56T00447.pdf>.

**Hagino, S., Itagaki, H., Kato, S. y Kobayashi, T.** "Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals". *Toxicology in Vitro*, 1993, (Japón) vol. 7, no. 1, pp. 35-39. ISSN 08872333. DOI 10.1016/0887-2333(93)90110-Q.

**Hagino, S., Itagaki, H., Kato, S., Kobayashi, T. y Tanaka, M.** "Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: Modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue". *Toxicology in Vitro*, 1991, (Japón) vol. 5, no. 4, pp. 301-304. ISSN 08872333. DOI 10.1016/0887-2333(91)90006-Y.

**Idrobo, T.P.** Evaluación ansiolítica comparativa por solventes de los extractos de hojas flores de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* mediante administración vía oral en ratones *Mus musculus*. [en línea]. (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. p.76 [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5720>.

**Inocente, M.Á., Toscano, E. y Castañeda, B.** “Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu , mediante el método Het Cam” . *Horizonte médico* [en línea], 2013, (Perú) vol. 1, pp. 5-7. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/259692290\\_Efecto\\_irritante\\_in\\_vitro\\_de\\_formulaciones\\_cosmeticas\\_con\\_extracto\\_de\\_camu\\_camu\\_mediante\\_el\\_metodo\\_Het\\_Cam](https://www.researchgate.net/publication/259692290_Efecto_irritante_in_vitro_de_formulaciones_cosmeticas_con_extracto_de_camu_camu_mediante_el_metodo_Het_Cam).

**Interagency Coordinating Committee On The Validation Of Alternative Methods (ICCVAM)**, 2010. “ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen ’ s Egg Test – Chorioallantoic Membrane ( HET-CAM ) Test Method. ICCVAM” *Test Method Evaluation Report* [en línea], 2010, vol. 13, no. 10, pp. B30-B38. ISSN 16616596. DOI 10.3390/ijms13089959. Disponible en: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.

**Jáuregui, A.M., Alvarado-Ortiz, C., Castañeda, B.C., Quiroz, J.R. y Yarasca, Á.** “Mieles Peruanas De Diferentes Fuentes Florales Determination of Phenolic Compounds , Total Flavonoids and Antioxidant Activity in Peruvian Honey From Different Flower ’ S Sources”. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2010, vol. 80, no. 4, pp. 287-297.

**Kanaya, Quercetina-3-O-galactosil-7-O-ramnósido.** [en línea]. Japón: Kanaya, 2018 [Consulta:4-01-2019]. Disponible en: <http://kanaya.naist.jp/Twins/top.jsp?keyword=C00005428&sword=50&mode=list1>.

**KAYANI, M.A. y PARRY, J.M.** The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicology in Vitro* [en línea], 2010, (Pakistán) vol. 24, no. 1, pp. 56-60. ISSN 08872333. DOI 10.1016/j.tiv.2009.09.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.003>.

**Khadra, A., Pinelli, E., Lacroix, M.Z., Bousquet-Melou, A., Hamdi, H., Merlina, G., Guiresse, M. y Hafidi, M.** “Assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [en línea], 2012, (France) vol. 76, no. 1, pp. 187-192. ISSN 01476513. DOI 10.1016/j.ecoenv.2011.10.012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.012>.

**Lagarto, A., Vega, R., Guerra, I. y González, R.** 2006. “*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*, 2006, (Cuba) vol. 20, no. 5, pp. 699-702. ISSN 08872333. DOI 10.1016/j.tiv.2005.10.003.

**Liebsch, M. y Spielmann, H.** “Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology”. *Toxicology Letters*, 2002, (Alemania) vol. 127, no. 1-3, pp. 127-134. ISSN 03784274. DOI 10.1016/S0378-4274(01)00492-1.

**Ma, T.H., Xu, Z., Xu, C., Mcconnell, H., Valtierra Rabago, E., Adriana Arreola, G. y Zhang, H.** “The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants”. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 1995, (USA) vol. 334, no. 2, pp. 185-195. ISSN 01651161. DOI 10.1016/0165-1161(95)90010-1.

**Madariaga, Y.G., Alfonso, O.C., Sánchez, C., Martínez, J.L.M., Espin, A.P. y Silveira, E.A.** “Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método *in vitro* en sustitución de la prueba en conejos” ( Ophthalmic irritability evaluation of cosmetic creams by in vitro method in substitution of the test in rabbits ). 2006, (España), vol. 7, pp. 1-7.

**Makhuvele, R., Matshoga, R.G., Antonissen, R., Pieters, L., Verschaeve, L. y Elgorashi, E.E.** “Genotoxicity and Antigenotoxicity of selected South African indigenous plants”. *South African Journal of Botany* [en línea], 2018, (Sudáfrica) vol. 114, pp. 89-99. ISSN 02546299. DOI 10.1016/j.sajb.2017.10.016. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.016>.

**Mancheno, M.J.** Determinación de las actividades fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular in vitro del extracto hidroalcohólico de *Lippia triphylla*. [en línea]. (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2018. pp. 50-53. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/bitstream/123456789/8898/1/56T00788.pdf>.

**Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. y Jesús Tuñón, M.** “Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia”. *Nutr. Hosp* [en línea], 2002, (España) no. 6, pp. 271-278. [Consulta: 2 enero 2019]. ISSN 0212-1611. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>.

**Martino, V.** “Los Flavonoides como Promisorios Agentes Preventivos y Terapéuticos”. [en línea], 200, (Argentina) vol. 19, no. 4, pp. 1. Disponible en: [http://www.latamjpharm.org/trabajos/19/4/LAJOP\\_19\\_4\\_3\\_1\\_34V5L4749H.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/19/4/LAJOP_19_4_3_1_34V5L4749H.pdf).

**Miranda, M., Cuellar, A.** Farmacognosia y química de los productos naturales, La Habana: Editorial Félix Varela. 2001. pp. 207-22.

**Montero, R., Arnáez, P., Esperón, F., Barro, B. y Pérez, A.** “Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores”. *Revista De Toxicología*, 2001, (España) vol. 18, no. 2, pp. 75-78. ISSN 02127113.

**Moreno, L.A. De, Marín, M. y Peña, D.** “Contenido de humedad, materia seca y cenizas totales en guayabas (*Psidiumguajava* L.) cosechadas en granjas del municipio Mara del estado Zulia”. *Revista Facultad de Agronomía*. 1999, (Venezuela) vol.1 , pp. 1-10.

**Murillo G, Pérez Marqués U, Tur E , Vinardell Mp, G.S.G. y P.J.** “Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular”. *Toxicología* [en línea], 2003, (Cuba) vol. 20, pp. 187-192. ISSN 02127113. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/919/91920305/>.

**Olivares, Y., Gaete, H. y Neaman, A.** “Evaluación de la fitotoxicidad y la genotoxicidad de suelos agrícolas de zonas con actividades mineras de cobre de la cuenca del río Aconcagua (Chile central)”. *Revista internacional de contaminación ambiental* [en línea], 2015, (Chile) vol. 31, no. 3, pp. 237-243. [Consulta: 2 enero 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992015000300003&fbclid=IwAR3Hw42tNWzEvYonyf9psh-gKcKbzuueMYMzK2\\_v4hoM5NA4yARJfijQtKU](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992015000300003&fbclid=IwAR3Hw42tNWzEvYonyf9psh-gKcKbzuueMYMzK2_v4hoM5NA4yARJfijQtKU).

**Organización Panamericana De La Salud.** Servicios farmacéuticos basados en la atención primaria de salud. Documento de posición de la Organización Panamericana de la salud/Organización Mundial de la Salud [en línea]. 2013, ISBN 9789275317501. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=21579&Itemid=270](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=21579&Itemid=270).



**Ortíz, C, Guitiérrez, A, Olmos, A.** Cuantificación de fenoles totales en *Amanthus hybridus*, *Cosmos bipinnatus* y *Cynodon dactylon*, plantas malezas del estado de Querétaro. 2010, (México) vol. 1, pp. 1-5.

**Palomino, L.R., García, C.M., Gil, J.H., Rojano, B.A. y Durango, D.L.** “Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia)”. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 2009, (Colombia) vol. 16, no. 3, pp. 388-395. ISSN 01214004 (ISSN).

**Picada, J., Da Silva, K., Erdtmann, B., Hentiques, A. y Henriques, J.** “Genotoxic effects of structurally related b-carboline alkaloids”. *The Cambridge Companion to Darwin*, 2009, (Brasil) vo. 1, pp. 9. ISSN 0027-5107. DOI 10.1017/CCOL9780521884754.005.

**Prieto García, F., Lechuga Vargas, M. De L.Á., Méndez Marzo, M.A., Barrado Esteban, E. y Ggaytán Oyarzún, J.C.** “Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. *Ciência y Tecnologia de Alimentos*” [en línea], 2006, (México) vol. 26, no. 1, pp. 94-97. [Consultado el: 2 de enero del 2019]. ISSN 0101-2061. DOI 10.1590/S0101-20612006000100016. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010120612006000100016&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612006000100016&lng=es&nrm=iso&tlng=es).

**QUIMINET.** *Todo sobre el hidróxido de sodio* [en línea]. España: 2008. [Consulta: 3 enero 2019]. Disponible en: <https://www.quiminet.com/articulos/todo-sobre-el-hidroxido-de-sodio-28284.htm>.

**Real Farmacopea Española.** Control de calidad de las drogas vegetales. 2ªed. Madrid, España: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002, pp. 85-90.

**Rébufa, C., Pany, I. y Bombarda, I.** “NIR spectroscopy for the quality control of Moringa oleifera (Lam.) leaf powders: Prediction of minerals, protein and moisture contents”. *Food Chemistry* [en línea], 2018, (Francia) vol. 261, pp. 311-321. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2018.04.066. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.066>.

**Repetto Jiménez, M. Y Repetto Kuhn, G.** Toxicología Fundamental. 2013, Vol.4. ed.3. no.1. ISBN 9788578110796.

**Reynel, C. y Marcelo, J.,** “Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Programa Regional ECOBONA-Intercooperation”, 2010, (Perú) vol.1 Serie Inve, pp. 158. ISSN 1359-7566. DOI 10.1080/13597569608420974.

**Ríos, L. y Acevedo, G.** 2007. Ecología, Utilización e Impactos producidos por el aprovechamiento del Cucharillo. *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. en las Parroquias de Taquil, Chantaco, Chuquiribamba y Gualiel de la Provincia de Loja. [en línea] (Tesis) Pregrado). Universidad nacional de loja, Loja, Ecuador, 2007. p. 50. DOI 10.1017/S0010417500000463. Disponible en: [http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5038/1/ECOLOGÍA%2C UTILIZACIÓN E IMPACTOS PRODUCIDOS POR EL APROVECHAMIENTO DEL.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5038/1/ECOLOGÍA%2C%20UTILIZACIÓN%20E%20IMPACTOS%20PRODUCIDOS%20POR%20EL%20APROVECHAMIENTO%20DEL.pdf).

**Rondon, M., Shirley, M., Xavier, C., Jaime, S., David, V., Rosa, S. y Jodie, D.** “Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador”. *Journal of King Saud University - Science* [en línea], 2018, (Ecuador) vol. 30, no. 4, pp. 500-505. ISSN 10183647. DOI 10.1016/j.jksus.2017.03.009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>.

**Samaniego, V.** Determinación de las actividades fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Buddleja incana* [en línea]. (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2018. pp. 49-51. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8894/1/56T00784.pdf>.

**Sánchez, L., Ali, N.S., Cano-Lamadrid, M., Noguera-Artiaga, L., Lipan, L., Carbonell-Barrachina, Á.A. y Sendra, E.** Flavors and Aromas [en línea]. 2019, (España). Elsevier Inc. ISBN 9780128132784. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132784000191>.

**Santamaría, S.A.** Evaluación de la actividad fotoprotectora *in vitro* de extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. [en línea]. (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 54-61. [Consulta: 2019-01-Disponible en: [http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4873/1/56T00613 UDCTFC.pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4873/1/56T00613%20UDCTFC.pdf).

**Silbergeld, E.K.** Toxicología, principios generales de la toxicología. 2da ed. España: Enciclopedia de salud y seguridad, 2000, p. 33.

**Silva, F.E.** Determinación de la dosis efectiva para actividad ansiolítica del extracto etanólico de hojas de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* en ratones *Mus musculus* mediante administración oral [en línea]. ] (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2017. p. 80. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/6425/1/56T00701.pdf>.

**Silva, V.M.** Dermatitis provocadas por plantas (fitodermatitis). *Anais Brasileiros de Dermatologia* [en línea], 2010, (Brasil) vol. 85, no. 4, pp. 479-489. [Consulta: 04 de enero del 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v85n4/v85n4a09.pdf>.

**Sisa, P.** Actividad gastroprotectora de los extractos metanólico, hexánico, y de acetato de etilo de *Oreocallis grandiflora* sobre ratones mediante el modelo de ulcera inducida por etanol/HCl [en línea]. (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2012. pp. 66-67. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2590/1/56T00367.pdf>.

**Soares, L.A.L., Bassani, V.L., González Ortega, G. y Petrovick, P.R.** “Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L”. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 2003, (Brasil) vol. 22, no. 3, pp. 203-207. ISSN 03262383.

**Sponchiado, G., Adam, M.L., Silva, C.D., Silva Soley, B., De Mello-Sampayo, C., Cabrini, D.A., Correr, C.J. y Otuki, M.F.** “Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review”. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2026, (Brasil) vol. 178, pp. 289-296. ISSN 18727573. DOI 10.1016/j.jep.2015.10.026. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>.

**Tene, V., Malagón, O., Finzi, P.V., Vidari, G., Armijos, C. y Zaragoza, T.** “An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador”. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, (Ecuador) vol. 111, no. 1, pp. 63-81. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2006.10.032.

**Vega, A., De León, J.A. y Reyes, S.M.** “Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá”. *Informacion Tecnologica*, 2017, (Panamá) vol. 28, no. 4, pp. 29-38. ISSN 07180764. DOI 10.4067/S0718-07642017000400005.

**Vinueza, D., Yanza, K., Tacchini, M., Grandini, A., Sacchetti, G., Chiurato, M.A. y Guerrini, A.** “Flavonoids in Ecuadorian *Oreocallis grandiflora* ( Lam .) R . Br .: Perspectives of Use of This Species as a Food Supplement”. *Hindawi-Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [en línea], 2018, (Ecuador) vol. 2018, pp. 4-7. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/1353129/>.

**Yanza, K.** Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica del extracto hidroalcohólico de flores y hojas de *Oreocallis grandiflora* [en línea]. (Tesis) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 68-71. [Consulta: 2019-01-04]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7929/1/56T00743.pdf>.

**Zalacain, M., Sierrasesúмага, L. y Patiño, A.** “El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos”. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 2005, (España) vol. 28, no. 2, pp. 227-236. ISSN 11376627. DOI 10.4321/S1137-66272005000300007

Anexo A: Evidencias fotográficas de la realización del trabajo de titulación.



Secado de las hojas de *Oreocallis grandiflora* y *Passiflora manicata*



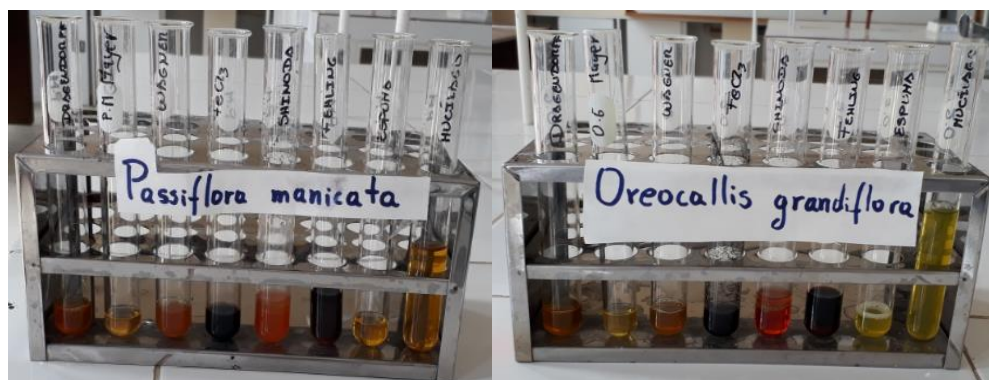
Trituración de la materia vegetal seca



Homogenización de los extractos en el Orbital Shaker



Control de calidad Físico-Químico de la materia vegetal



Tamizaje fitoquímico de *Passiflora manicata* y *Oreocallis grandiflora*



Concentración del extracto en el Rota vapor



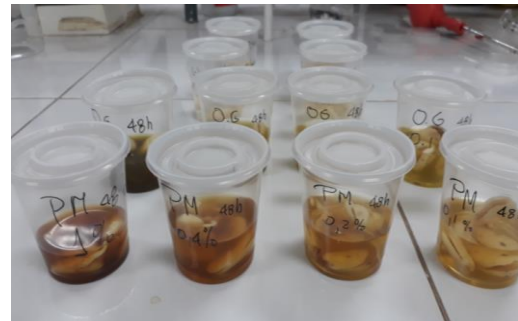
Extracto seco de *O. grandiflora* y *P. manicata*



Extractos de *P. manicata* y *O. grandiflora* para ser usados en las pruebas de seguridad *in vitro*



Crecimiento de radículas de *vicia faba* para el ensayo de genotoxicidad



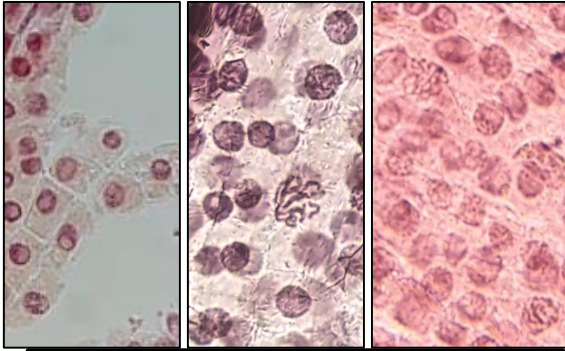
Semillas de *vicia faba* en los extractos a diversas concentraciones



Hidrólisis de las radícula de *vicia faba* en HCl 5N



Tinción de las radículas de *vicia faba* con Orceína



Células de *vicia faba* en las etapas de la mitosis



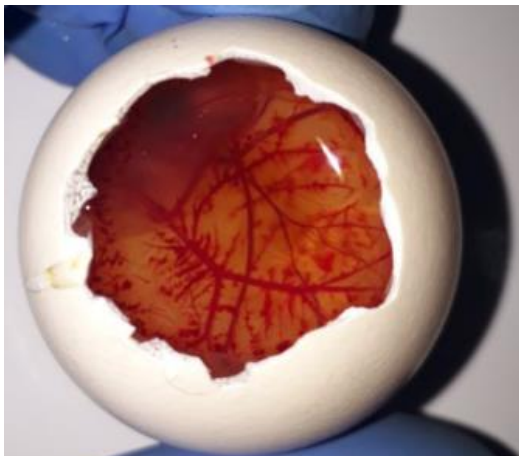
Célula de *vicia faba* con micronúcleo



Membrana corioalantoidea para el ensayo de irritación ocular HET-CAM



Aplicación de los extractos sobre la membrana corioalantoidea



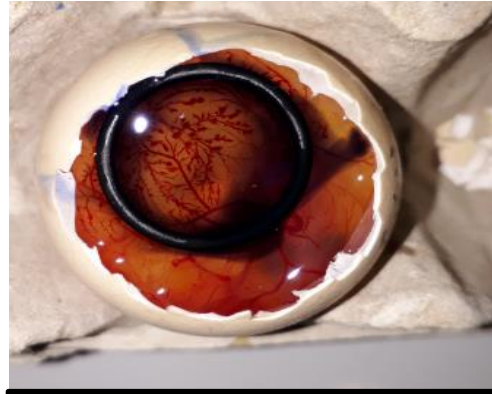
Membrana corioalantoidea después de la aplicación del control positivo



Membrana corioalantoidea después de la aplicación del control negativo



Huevos de gallina con los extractos a diferentes concentraciones (Ensayo HET-CAM)



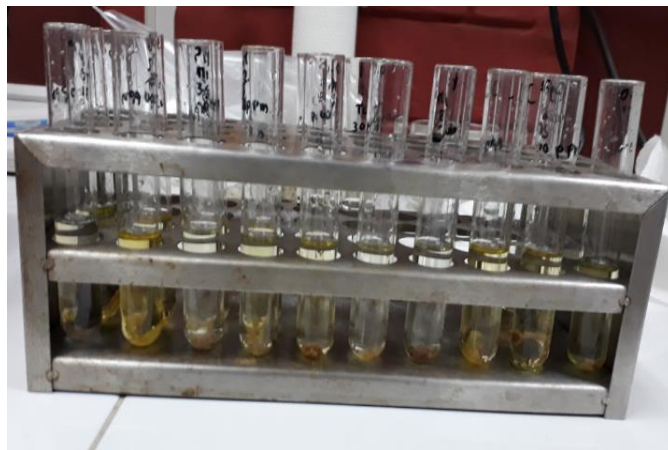
Aplicación del colorante azul tripán sobre la membrana corioalantoidea expuesta al control positivo



Extirpación de la membrana corioalantoidea para el ensayo CAM-TBS







Huevos de gallina después de la extirpación de la membrana corioalantoidea (Ensayo CAM-TBS)



Membranas corioalantoideas en dimetil formamida para la determinación de la cantidad de azul tripán absorbido



**Anexo B:** contrato de acceso a recursos genéticos suscrito entre la ESPOCH y el Ministerio del Ambiente del Ecuador MAE-DNB-CM-2018-0086.

	SECRETARIA GENERAL
	Ministerio del Ambiente FECHA REG 14 SEP 2018
	REGISTRO 6367
	FOLIO 402
	MINISTERIO DEL AMBIENTE
	

**CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, A TRAVÉS DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL Y LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.**

MAE-DNB-CM-2018-0086

**COMPARECIENTES:**

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado: "**ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE**" comparecen, por una parte el MINISTERIO DEL AMBIENTE, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el LCDO. LÓPEZ MORA ALFREDO DANILLO, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, conforme se desprende de la Acción de Personal Nro. 0945 de 02 de mayo de 2018, delegado de la máxima autoridad mediante Acuerdo Ministerial Nro. 024 de 09 de marzo de 2016, publicado en el Registro Oficial Nro. 725 de 04 de abril de 2016, a quien en adelante se le denominará "MAE"; y, por otra parte, la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, debidamente representada por el Ing. BYRON ERNESTO VACA BARRAHONA PhD., en su calidad de Rector, conforme consta del certificado emitido por el Ab. Carlos de la Cadena, Secretario General, documento que se agrega como habilitante y a quien en adelante se denomina "ESPOCH".

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del programa de investigación científica denominado "**ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE**" contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

**PRIMERA. ANTECEDENTES.-**

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3 numeral 7 establece que son deberes primordiales del Estado "(...)7. Proteger el patrimonio natural y cultural del país. (...)" y 83 numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades de las ecuatorianas y los ecuatorianos "(...) 6. Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible (...) 13. Conservar el patrimonio cultural y natural del país, y cuidar y mantener los bienes públicos (...)";
2. El artículo 14 de la Norma Suprema determina que: "...Se reconoce el derecho de la p

Calle Madrid 1159 y Andalucía Código Postal: 170517 / Quito - Ecuador. Teléfono: 593-2 398-7600