



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

ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *IN VITRO* DE EXTRACTOS
DE *Halenia weddeliana* Gilg

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: JOHNNY JOSÉ SINMALEZA MONAR
TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2015

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

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE *Halenia weddeliana* Gilg, de responsabilidad del señor Johnny José Sinmaleza Monar, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Lcda. Karen Acosta

MIEMBRO DE TRIBUNAL

NOTA DE TRABAJO ESCRITO.....

.....
DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH

Yo, Johnny José Sinmaleza Monar soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

JOHNNY JOSÉ SINMALEZA MONAR

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y permitirme cumplir una de mis metas, por el apoyo al guiarme a lo largo de la vida.

A mis padres y hermanos por estar incondicionalmente apoyándome en todo momento de mi vida.

A mis demás seres queridos y amigos que de una u otra forma han sido parte de las penas y glorias a lo largo mi estudio universitario.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela superior Politécnica de Chimborazo por abrirme las puertas y permitir educarme en tan prestigiosa Institución.

A mis padres y hermanos, familiares y amigos por su apoyo que ha sido realmente útil y confortante para mi superación día a día.

A mi Tutor y Colaborador del Trabajo de Titulación por prestarme su apoyo, conocimientos y su amistad que es muy importante.

Johnny

TABLA DE CONTENIDO

| | Páginas |
|----------------------------------------------------------------------------|----------|
| RESUMEN..... | xii |
| SUMARY..... | xiii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPITULO I | |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación..... | 5 |
| 1.2. Antecedentes de investigación..... | 5 |
| 1.3. Bases Teóricas..... | 6 |
| 1.3.1. <i>Luz Solar</i> | 6 |
| 1.3.2. <i>Radiación Ultravioleta</i> | 7 |
| 1.3.3. <i>Tipos de Radiación UV</i> | 7 |
| 1.3.4. <i>Cantidad de Radiación UV Solar Recibida</i> | 8 |
| 1.3.5. <i>Fotobiología Cutánea</i> | 9 |
| 1.3.6. <i>Variación de la Reactividad Solar en Personas Normales</i> | 11 |
| 1.3.7. <i>Efectos de la Radiación Solar en la Piel</i> | 12 |
| 1.3.8. <i>Fotodermatosis</i> | 14 |
| 1.3.9. <i>Cáncer de Piel</i> | 15 |
| 1.3.9.1. <i>Tipos de Cáncer de Piel</i> | 16 |
| 1.3.9.1.1. <i>Carcinoma de células basales</i> | 16 |
| 1.3.9.1.2. <i>Carcinoma de células escamosas</i> | 17 |
| 1.3.9.1.3. <i>El melanoma</i> | 18 |
| 1.3.10. <i>Fotoprotección</i> | 18 |
| 1.3.11. <i>Fotoprotección Natural de la Piel</i> | 19 |

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------|----|
| 1.3.12. | <i>Filtros solares</i> | 19 |
| 1.3.13. | <i>Clasificación de los Filtros Solares</i> | 19 |
| 1.3.13.1. | <i>Filtros físicos</i> | 19 |
| 1.3.13.2. | <i>Filtros químicos</i> | 19 |
| 1.3.13.3. | <i>Filtros Biológicos</i> | 20 |
| 1.3.14. | <i>Factor de protección solar (SPF)</i> | 20 |
| 1.3.15. | <i>Antioxidantes</i> | 21 |
| 1.3.16. | <i>Antioxidantes Naturales</i> | 21 |
| 1.3.17. | <i>Flavonoides en Vegetales y su Función</i> | 22 |
| 1.3.18. | <i>Cacho de Venado (Halenia weddeliana Gilg)</i> | 24 |
| 1.3.18.1. | <i>Descripción Botánica “Características”</i> | 24 |
| 1.3.18.2. | <i>Origen y Distribución</i> | 24 |
| 1.3.18.3. | <i>Propiedades Terapéuticas</i> | 24 |

CAPITULO II

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. | MARCO METODOLÓGICO | 25 |
| 2.1. | Lugar de la Investigación | 25 |
| 2.2. | Recolección del Material Vegetal | 25 |
| 2.3. | Identificación Botánica y Taxonómica | 25 |
| 2.4. | Determinación del Contenido de Humedad | 25 |
| 2.5. | Determinación de Cenizas Totales | 26 |
| 2.6. | Determinación de Cenizas Solubles en Agua | 27 |
| 2.7. | Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico | 28 |
| 2.8. | Tamizaje Fitoquímico | 29 |
| 2.9. | Análisis Físicoquímicos Cualitativos | 29 |
| 2.9.1. | <i>Reacciones de Caracterización</i> | 29 |
| 2.10. | Obtención del Extracto EtOH y Subextractos de <i>Halenia weddeliana</i> Gilg | 32 |

| | | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.11. | Determinación del contenido de Fenoles Totales..... | 32 |
| 2.12. | Determinación del contenido de Flavonoides Totales..... | 32 |
| 2.13. | Determinación de Factor de Protección Solar (SPF) in vitro..... | 33 |
| 2.14. | Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida..... | 34 |

CAPITULO III

| | | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. | MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 35 |
| 3.1. | Análisis, interpretación y discusión de resultados..... | 35 |
| 3.1.1. | <i>Determinación del Contenido de Humedad.....</i> | 35 |
| 3.1.2. | <i>Determinación de Cenizas Totales.....</i> | 35 |
| 3.1.3. | <i>Determinación de Cenizas Solubles en Agua.....</i> | 36 |
| 3.1.4. | <i>Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.....</i> | 36 |
| 3.1.5. | <i>Tamizaje Fitoquímico.....</i> | 36 |
| 3.1.6. | <i>Rendimiento y cantidad de los Subextractos de Halenia weddeliana Gilg.....</i> | 37 |
| 3.1.7. | <i>Análisis Cualitativo de los Grupos Fitoquímicos por TLC.....</i> | 37 |
| 3.1.8. | <i>Determinación del contenido de Fenoles Totales.....</i> | 38 |
| 3.1.9. | <i>Determinación del contenido de Flavonoides Totales.....</i> | 39 |
| 3.1.10. | <i>Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) in vitro.....</i> | 41 |
| 3.1.11. | <i>Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida.....</i> | 43 |
| 3.2. | Pruebas de hipótesis..... | 44 |
| 3.3. | Presentación de resultados..... | 46 |

| | |
|-------------------|----|
| CONCLUSIONES..... | 58 |
|-------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| RECOMENDACIONES..... | 59 |
|----------------------|----|

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

| | Páginas |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Tabla 1-1 La radiación electromagnética según la longitud de onda..... | 7 |
| Tabla 2-1 Fototipos cutáneos (SPT)..... | 11 |
| Tabla 3-1 Clasificación simplificada de Reacciones de la piel a la luz solar..... | 13 |
| Tabla 4-1 Clasificación del Factor de Protección Solar (SPF) (COLIPA)..... | 20 |
| Tabla 5-1 Clasificación del Factor de Protección Solar (SPF) (FDA)..... | 21 |
| Tabla 1-3 Extractos con su correspondiente Rf y metabolito identificado..... | 37 |
| Tabla 2-3 Concentración de Fenoles y Flavonoides Totales..... | 44 |
| Tabla 3-3 Valores de SPF de los diferentes extractos de <i>Halenia weddeliana</i> Gilg..... | 45 |
| Tabla 4-3 Resultados de la Humedad \pm DE..... | 47 |
| Tabla 5-3 Resultados de Cenizas Totales..... | 47 |
| Tabla 6-3 Resultados de Cenizas Solubles en Agua \pm DE..... | 47 |
| Tabla 7-3 Resultados de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico en Agua \pm DE..... | 47 |
| Tabla 8-3 Resultados del Tamizaje Fitoquímico..... | 48 |
| Tabla 9-3 Resultados del rendimiento de los subextractos objeto de estudio..... | 49 |
| Tabla 10-3 Resultados del perfil cromatográfico visto por UV..... | 50 |
| Tabla 11-3 Resultados de la concentración de Fenoles Totales..... | 51 |
| Tabla 12-3 Resultados de la concentración de Flavonoides Totales..... | 51 |
| Tabla 13-3 Resultados del SPF otorgado por el subextracto hexánico..... | 52 |
| Tabla 14-3 Resultados del SPF otorgado por el subextracto clorofórmico..... | 53 |
| Tabla 15-3 Resultados del SPF otorgado por el subextracto con acetato de etilo..... | 53 |
| Tabla 16-3 Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto hexánico | 54 |
| Tabla 17-3 Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto clorofórmico..... | 55 |
| Tabla 18-3 Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto con acetato de etilo | 56 |
| Tabla 19-3 Controles negativos (Hexano, Cloroformo, Acetato de Etilo)..... | 57 |

INDICE DE ILUSTRACIONES

| | Páginas |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Figura 1-1 Fotobiología. Vía desde la absorción de la luz hasta los efectos biológicos observables..... | 10 |
| Figura 2-1 Penetración de la radiación UV en la piel..... | 12 |
| Figura 3-1 Clasificación de las fotodermatosis..... | 15 |
| Figura 4-1 Efectos inmunosupresores de la radiación UV..... | 17 |
| Figura 5-1 Ácidos antioxidantes fenólicos..... | 22 |
| Figura 6-1 Antioxidantes flavonoides..... | 23 |
| Figura 7-1 <i>Halenia weddeliana</i> Gilg..... | 24 |
| Figura 1-2 Técnica para el tamizaje Fitoquímico..... | 29 |
| Figura 2-2 Técnica para el tamizaje Fitoquímico extracto etéreo..... | 30 |
| Figura 3-2 Técnica para el tamizaje Fitoquímico extracto acuoso..... | 31 |
| Figura 4-2 Los valores de EE X I..... | 34 |
| Figura 1-3 Curva de calibración del ácido gálico..... | 39 |
| Figura 2-3 Comparativa de la cantidad de Fenoles Totales entre Subextractos..... | 39 |
| Figura 3-3 Curva de calibración del ácido gálico..... | 40 |
| Figura 4-3 Comparativa de la cantidad de Flavonoides Totales entre Subextractos..... | 41 |
| Figura 5-3 Diagrama de Caja-Bigotes Comparativo Medias (SPF) \pm DE..... | 42 |
| Figura 6-3 Histograma de los subextractos..... | 43 |
| Figura 7-3 Fotoprotección celular del subextracto hexánico..... | 45 |
| Figura 8-3 Fotoprotección celular del subextracto clorofórmico..... | 46 |
| Figura 9-3 Fotoprotección celular del subextracto con acetato de etilo..... | 46 |
| Figura 10-3 Comparativa del subextracto hexánico vs (ESTÁNDAR 1 y 2)..... | 55 |
| Figura 11-3 Comparativa del subextracto clorofórmico vs (ESTÁNDAR 1 y 2)..... | 56 |
| Figura 12-3 Comparativa del subextracto con acetato de etilo vs (ESTÁNDAR 1 y 2)..... | 57 |

INDICE DE ANEXOS

- Anexo A** Control de Calidad del vegetal
- Anexo B** Tamizaje Fitoquímico
- Anexo C** Absorbancias para curva de calibración del ácido gálico
- Anexo D** Espectro de absorción para la curva de calibración de quercetina
- Anexo E** Absorbancias para curva de calibración de quercetina
- Anexo F** Análisis estadístico del SPF
- Anexo G** Estudio de Niveles de SPF *in vitro* en protectores solares comerciales
- Anexo H** Estudio de niveles de SPF *in vitro* de protectores solares
- Anexo I** Cuantificación de flavonoides y fenoles totales⁷⁵
- Anexo J** Verificación de absorbancias para determinar SPF₇₅
- Anexo K** Preparación de agar Mueller Hinton y cultivo de *Escherichia coli* a diferentes tiempos de irradiación UV-B
- Anexo L** *Escherichia coli* al cultivarse minutos después de irradiarse con UV-B, Estándar Pamidato-O (P-O) y Octilmetoxicinamato (OMC); Subextracto Hexánico (H), Clorofórmico (C) y con Acetato de etilo (Ac. E.)

RESUMEN

Nuestro país al estar ubicado en la zona ecuatorial está expuesto a mayor dosis de radiación ultravioleta solar provocando diversas afecciones a la piel como carcinomas, fotoenvejecimiento, etc., de manera que este estudio va orientado a mejorar la calidad de vida. La presente investigación evaluó el potencial fotoprotector de los diferentes extractos de [cacho de venado] *Halenia weddeliana* Gilg. El estudio se realizó en los laboratorios de productos naturales y clínicos pertenecientes a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para verificar la presencia de compuestos fenólicos se realizó un análisis fitoquímico cualitativo. Se comprobó el contenido de fenoles y flavonoides totales por los métodos Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio, respectivamente. Posteriormente se determinó el [SPF] Factor de Protección Solar *in vitro* por el método espectrofotométrico desarrollado por Mansur, seguido el efecto fotoprotector contra la radiación ultravioleta-B por muerte celular inducida mediante exposición a diferentes tiempos utilizando *Escherichia coli*. El análisis fitoquímico cualitativo demostró la presencia de lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, grasas, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, quinonas, catequinas y flavonoides. Los contenidos fenólicos y flavonoides totales más representativos fue $15,63 \pm 0,14$ mg de equivalentes de ácido gálico/g y $1,72 \pm 0,0009$ mg de equivalentes de quercetina respectivamente para el extracto con acetato de etilo. Los extractos de *Halenia weddeliana* Gilg mostraron bandas de absorción características en las regiones ultravioleta-B con el mayor [SPF] Factor de Protección Solar *in vitro* $22,55 \pm 0,02$ que corresponde a la fracción de acetato de etilo a 25 ppm, que a su vez con 2mg/mL otorgó mejor fotoprotección a las *Escherichia coli* irradiadas con ultravioleta-B. En conclusión, se puede utilizar como fotoprotector en formulaciones farmacéuticas a futuro.

Palabras clave: <[CACHO DE VENADO] *Halenia weddeliana* Gilg>, <ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA>, <FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR>, <ULTRAVIOLETA-B>, <[BACTERIA DEL INTESTINO GRUESO] *Escherichia coli*>, <MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO>.

SUMMARY

Ecuador, located on the Equator, is exposed to larger doses of ultraviolet (UV) radiation causing different skin diseases such as carcinoma, photo aging, etc. This study aims at improving quality life, so potential photoprotection from different extracts of *Halenia weddeliana* Gilg (cacho de venado), was evaluated in the present investigation. The study was carried out at the Natural and Clinic Product Laboratory belonging to Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. A qualitative phytochemical analysis was done to verify the presence of phenolic compounds. The total phenol and flavonoid contents were found with the Folin-Ciocalteu and aluminum chloride methods, respectively. Later, the sun protection factor (SPF) *in vitro* was determined using the spectrophotometric method developed by Mansur. Then the photoprotection effect against UVB radiation by cell death induced through exposition to different times using *Escherichia coli*. The lacton, coumarin, triterpen, steroid, fat, sugar, reducer, saponin, phenol, tannis, quinon, cathequin and flavonoid presence was determined with the qualitative phytochemical analysis. The most characteristic phenolic and flavonoid contents were 15.63 ± 0.14 mg of gallic acid/g and 1.72 ± 0.0009 mg of quercetin respectively for the ethyl acetate extract. The *Halenia weddeliana* Gilg extracts showed absorption band in the UVB regions with more SPF *in vitro* 22.55 ± 0.02 related to the ethyl acetate fraction at 25 ppm, which provided better photoprotection – 2 mg/mL to the *Escherichia coli* irradiated with UVB. In conclusion, it can be used as protoprotection in further pharmaceutical formulations.

Key words: <[CACHO DE VENADO] *Halenia weddeliana* Gilg>, <PHOTO PROTECTION ACTIVITY>, <SUN PROTECTION FACTOR>, <ULTRAVIOLET-B>, <[LARGE INTESTINE BACTERIA] *Escherichia coli*>, <SPECTROPHOTOMETRIC METHOD>.

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática

La presente tiene como finalidad contribuir a la investigación Institucional y Nacional tomando en cuenta el Plan Nacional Para El Buen Vivir 2013 – 2017, Objetivo N°3: Mejorar la Calidad de Vida de la Población. (SENPLADES, 2013, pp. 135-152).

La situación problemática a tratar va orientado a la prevención del cáncer de piel que en nuestro país crece rápidamente colocándose en 2^{do} lugar como causa de muerte producto del cáncer según datos de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador (SOLCA), “además en el Registro Nacional de Tumores de nuestro país (RNT) para el año 2005 en Quito el carcinoma de células basales (CBC) fue del 65,1% mientras que el carcinoma de células escamosas (CSC) el 21,3%, donde prevalecen el CBC con el CSC y en muy poco porcentaje el melanoma” (SOLCA Quito, 2014).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), “en el año 2012 ya había ocurrido 8,2 millones de decesos. En el año 2002 aproximadamente hubo unas 60 mil muertes producto de la radiación UV: 48 mil por melanomas y 12 mil a causa del carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas” (OMS, 2011).

Hay que destacar las estadísticas e índice de cáncer de la piel, datos del Ministerio de Salud Pública donde “la tasa de mortalidad en el Ecuador producto del cáncer por medio de registros hospitalarios de tumores en el año 2010 fue de 64,22 por 100.000 habitantes y entre los tipos de cáncer más frecuentes que afectan a los ecuatorianos encontramos el cáncer de piel (no melanoma)” (Ministerio De Salud Pública, 2013).

Ahora la situación no es nada favorable para nuestro país ya que está ubicado en la zona ecuatorial donde los rayos solares (UV-A, UV-B e IR) caen perpendicularmente en mayor proporción que en el resto del planeta durante el año haciendo a la población ecuatoriana más propensa al cáncer de piel, de ahí la importancia de un estudio que permita contribuir a la prevención de este mal, lo cual a través de este estudio lograremos dar a conocer que en nuestro país ventajosamente existen plantas con posibles propiedades que nos permitirían demostrar su efectividad contra la radiación UV, en este caso el objeto de estudio es una planta nativa de los páramos Ecuatorianos que científicamente se la conoce como *Halenia weddeliana* Gilg, de nombre común cacho de venado o Taryga Yuyu; y con la finalidad de dejar una pauta para elaboración de posibles productos nacionales que contribuyan a mejorar la calidad de vida de la población.

Formulación del Problema

Problema General:

↪ ¿Los extractos de *Halenia weddeliana* Gilg presentan actividad fotoprotectora para *Escherichia coli* irradiada con luz UV?

Problemas específicos:

↪ ¿Los extractos de *Halenia weddeliana* Gilg presentan compuestos fenólicos y flavonoides?

↪ ¿El factor de protección solar (SPF) *in vitro* de los extractos de *Halenia weddeliana* Gilg realizado por espectrofotometría es mayor al factor mínimo de protección solar?

↪ ¿Los extractos de *Halenia weddeliana* presentan efecto fotoprotector a través de la muerte celular inducida en cepa de *Escherichia coli*?

Justificación teórica

La presente investigación es de vital importancia ya que se encarga de estudiar medidas de protección ante un problema muy serio que afecta a la población ecuatoriana y resto del mundo: los problemas de salud ocasionados por la radiación UV. El problema radica en que a mayor altura mayor es la cantidad de radiación UV que se recibe y en la región costera la arena releja los rayos UV, por este motivo la población ecuatoriana tiene mayor riesgo, a esto se suma el deterioro de la capa de ozono. Según datos del “informe Hiperión de la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA) la radiación supera el índice máximo tolerable con valor de 11 IUV, en Guayaquil es de 14 IUV y para Quito es 24 IUV” (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008).

La porción de la radiación UV que es de interés a estudiar es la UV-A y B, debido principalmente a los daños que causa sobre la piel como por ejemplo la “UV-A tiende a llegar más profundamente sobre la epidermis, la dermis provocando serios daños a la piel como envejecimiento prematuro y está ligado a cáncer de piel (melanoma)” (Figueiredo et al., 2014, p. 65).

Por otro lado se encuentra la porción UV-B que es más grave pues una exposición prolongada causaría daños a la piel como “eritema, hiperplasia, inmunosupresión, cáncer de piel, entre otros. La porción UV-C no se la tomará en cuenta porque “es absorbida completamente en la capa de ozono” (De Oliveira et al., 2013, p. 102).

A nivel mundial mueren millones de personas producto del cáncer, pero este mal se debe a predisposiciones genéticas y el fototipo de piel, podemos mencionar que la población albina es la más afectada ya que su tipo de piel no se broncea y la falta de melanina hace que los rayos UV provoquen daños muy graves en la piel. La Tasa Estandarizada de los principales tipos de cáncer en Guayaquil en el 2010 para las mujeres el cáncer de piel no melanoma fue de 22,81% y para los varones fue de 27,81% ubicándose en el segundo lugar por debajo de cáncer de mama y cáncer de próstata respectivamente (SOLCA Guayaquil, 2010).

Ahora la realidad en Quito no es favorable ni nada alentador puesto que datos del 2010 proporcionados por el RHT que también son manejados por SOLCA Quito, muestra al cáncer de piel no melanoma ocupa el quinto lugar en las mujeres con el 6,82%, mientras que en los varones hay un incremento considerable pues ocupa un segundo lugar con el 13,67% (SOLCA Quito, 2014).

Por este motivo es muy conveniente este estudio porque generará conocimiento, contribuye a la investigación en la Institución y va dirigido a mejorar la calidad de vida de la población ecuatoriana tomando en cuenta el objetivo N°3 del Plan Nacional Para El Buen Vivir 2013 – 2017 antes mencionado.

Este proyecto es viable debido porque el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH cuenta con los equipos y reactivos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Justificación práctica

Cabe resaltar que la radiación UV no solo afecta a los seres humanos, también a las plantas pues pueden dañar sus componentes celulares y por esta razón ciertas plantas han desarrollado mecanismos para protegerse por medio de la producción de metabolitos que les ayudan a contrarrestar, absorber y disipar la radiación, hecho logrado gracias a los compuestos fenólicos y antioxidantes sintetizados (Hupel et al., 2011, pp. 362-364).

En la actualidad se ha valorado el potencial de los metabolitos extraídos de estas plantas por su acción contra los rayos UV y son objeto de estudio para elaborar posibles filtros solares como es el objetivo de la presente investigación en el que se determinará por método *in vitro* la actividad fotoprotectora de *Halenia weddeliana* Gilg utilizando un simulador de luz solar como es la lámpara que emite radiación UV-B para determinar el Factor de Protección Solar (SPF) de los extractos de la planta.

La investigación se da en base a estudios de plantas del género *Halenia* que presentaron “fuerte actividad antioxidante como la *Halenia elliptica*” (Huang et al., 2011, pp. 185-190).

Otra especie que presentó actividad antioxidante por su contenido de “xantonas, secoiridoides y flavonoides es la *Halenia corniculata*” (Rodríguez et al., 1995, pp. 1265-1272).

Y de esta manera se demuestra que este estudio es de gran importancia e interés, novedoso porque abarca no solo a la población Nacional sino nivel Internacional; además viable pues se cuenta con el recurso humano y equipos necesarios para llevar a cabo la investigación en el Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Objetivos

Objetivo general

- ↪ Evaluar la actividad fotoprotectora *in vitro* de extractos de *Halenia weddeliana* Gilg mediante radiación ultravioleta.

Objetivos específicos

- ↪ Realizar la caracterización farmacognósica y fitoquímica de los extractos de *Halenia Weddeliana* Gilg.
- ↪ Determinar el factor de protección solar (SPF) *in vitro* de los extractos sometidos a radiación UV-B por espectrofotometría.
- ↪ Determinar el efecto fotoprotector a través de la muerte celular inducida en cepa de *Escherichia coli* por radiación UV-B.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

La investigación científica es propia del ser humano aunque no se perciba, como personas siempre estamos investigando, tratando de solucionar problemas o encontrar respuestas, este hecho no siempre es visto como una realidad en la vida diaria.

Para tomar la decisión de investigar habrá que tener en cuenta que es un arduo trabajo que conllevan muchos sacrificios ya que no hay caminos fáciles, de otra manera no hubiera el mérito y la satisfacción que implica culminar la tarea investigativa que nos proponemos. El investigador es un creador, pues genera conocimientos al mismo tiempo que aprende de las experiencias adquiridas a lo largo del estudio planteado, además son necesarias las premisas filosóficas y epistemológicas para facilitar el conocimiento de las tareas ejecutadas, así como los riesgos asumidos en caso de presentar problemas, de esta manera se puede indagar que el presente estudio tiene la finalidad de investigar para general conocimiento y contribuir a la mejora de calidad de la población (González, 2008, pp. 1-2).

1.2. Antecedentes de investigación

En la antigüedad era menos los casos de problemas relacionados a la radiación UV porque el estilo de vida de las personas era más conservador e incluso se reflejaba en su vestimenta que era muy discreta y gracias a esas prendas de vestir se protegían de los rayos del sol, mientras que en la actualidad con el estilo de vida y costumbres nos pone en contacto con la radiación.

Hoy en día debido al incremento de afecciones a la piel como fotoenvejecimiento, eritemas, carcinomas, melanomas, entre otros producto de la radiación UV-A y B se han desarrollado diferentes estudios, basándose últimamente en compuestos naturales como es la investigación de extractos de plantas ya que éstas también son afectadas por la radiación solar desarrollando compuestos para protegerse de la misma siendo los compuestos fenólicos y antioxidantes los más importantes (De Oliveira et al., 2013).

Existen otras investigaciones de extractos secos para poder evaluar el potencial fotoprotector por espectrofotometría *in vitro*, así mismo determinando la presencia de antioxidantes y compuestos

fenólicos ya sea por cualquier método como el colorimétrico o TLC, la finalidad es encontrar nuevos principios activos e incluirlos en formulaciones farmacéuticas (Violante et al., 2009, pp. 252-253).

El presente estudio tiene la finalidad de estudiar la planta *Halenia weddeliana* con el fin de demostrar su capacidad fotoprotectora; esto en *Escherichia coli* y por espectrofotometría en base a estudios ya comprobados sobre metabolitos fenólicos y antioxidantes existentes en otras especies de plantas y del mismo género *Halenia* (Sun et al., 2012, pp. 169-176).

Existen tipos de estudios en los que compararemos y nos basaremos como son pruebas *in vivo* e *in vitro* de fórmulas de protección solar, especies de plantas que se han investigado. Por ejemplo estudios donde se determina *in vivo* la actividad fotoprotectora en ratones sin pelo (Sayre et al., 1979, pp. 559-566). Otros estudios realizados fueron el análisis de fenoles totales y otros sustratos de oxidación y antioxidantes por medio del reactivo Folin-Ciocalteu los cuales será de utilidad para la ejecución de esta investigación (Singleton et al., 1999, pp. 152-178).

También se encuentra la cuantificación de flavonoides (Dewanto et al., 2002, pp. 3010-3014), otras investigaciones de relevancia son los estudios de actividades fotoprotectora y antioxidante *in vitro* (De Oliveira et al., 2013, pp. 122-127), de la cual se tomará en cuenta el factor de protección solar (SPF) así como sus resultados y metodología e importancia. Siguiendo este tipo de investigación se encuentra las pruebas de protección solar: La correspondencia entre los datos *in vitro* y los valores reportados por los fabricantes realizado por (Garoli et al., 2008, pp. 193-204); y la Actividad fotoprotectora de *Buddleja scordioides* realizado por (Acevedo et al., 2005, pp. 301-309) donde se determina principalmente la actividad fotoprotectora en muerte inducida por radiación UV en *Escherichia coli*; las cuales nos serán de vital importancia.

En conclusión, la importancia radica en que la investigación pueda ser utilizada como base para preparaciones farmacéuticas de uso cosmético que sirva de protección contra la radiación UV del sol.

1.3. Bases Teóricas

1.3.1. Luz Solar

Claro está que la luz solar es de gran utilidad o indispensable para la vida ya que sin ésta el planeta se tornaría en un mundo oscuro sin vida y congelado. La luz solar es un tipo de energía electromagnética, es decir transmite radiación, la misma que es utilizada o que genera impactos en la Tierra como por ejemplo, las plantas utilizan la luz solar para el proceso de fotosíntesis, los seres humanos la utilizamos para la síntesis de la vitamina D, en general todos los seres vivos

utilizamos esta energía de manera directa o indirecta. Aproximadamente llega a estar en contacto con la superficie terrestre del 2 al 3% de radiación UV la misma que nos trae beneficios y complicaciones en dependencia al tiempo de exposición, 32% de luz visible que es indispensable para realizar las actividades diarias de los seres vivos, y el 60% de radiación infrarroja que es de vital importancia ya que permite que nuestro planeta se mantenga caliente y pueda albergar la vida (Zubeldia et al., 2012, pp. 207-213).

1.3.2. Radiación Ultravioleta

La parte del espectro electromagnético de importancia en fotobiología médica es la radiación ultravioleta y visible cuyas longitud de onda oscila de 200 a 760 nm, la importancia radica en que las dos van a entrar en contacto con los seres vivos y va a repercutir en una reacción que puede ser favorable o no. A medida que han pasado los años la ciencia le ha dado mayor enfoque al estudio de la radiación electromagnética, tanto es así que a la radiación ultravioleta se la ha subdividido en diferentes rangos de longitud de onda (ver Tabla 1-1).

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

| Banda de ondas | Rango de longitud de onda (nm) |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| De rayos X | 0,1-10 |
| Ultravioleta en el Vacío | 10-200 |
| Ultravioleta C | 200-290 |
| Ultravioleta B | 290-320 |
| Ultravioleta A (UV-A) | 320-400 |
| UV-A I | 340-400 |
| UV-A II | 320-340 |
| Visible | 400-760 |
| Infrarrojo cercano | 760-1000 |
| Infrarrojo lejano | 1000-100,000 |
| Microondas y ondas de Radio | > 10 ⁶ |

Fuente: Goldsmith, 2012.

1.3.3. Tipos de Radiación UV

Empezaremos con la radiación UV-C, que afortunadamente en su totalidad es absorbida en la capa de ozono, es muy peligrosa para la vida en la Tierra ya que si al llegar hacer contacto con la piel u otras superficies de seres vivientes generaría un daño a nivel del ADN tornándose letal, por eso también es conocida como germicida y en un rango de 200 a 290 nm; en la actualidad existen

lámparas que emiten este tipo de radiación muy peligrosa y es usada para esterilizar el agua o aire, se las utiliza con mucho cuidado de lo contrario los efectos son lamentables.

La siguiente es la radiación UV-B, llega a la superficie terrestre a nivel del mar en un 5% del total de la radiación UV, y representa apenas el 0,5% de la radiación total que llega a la tierra; pero, aunque parezca un poco insignificante en porcentaje, es la más peligrosa ya que al entrar en contacto con la piel llega a producir eritemas, fotoenvejecimiento, carcinogénesis entre otros. Claro está que la cantidad de esta radiación depende de la estación en que nos encontremos pues es más fuerte en el verano, también depende de la hora del día a la que se exponga, las nubes, vestimenta entre otros. Dado este motivo se han creado filtros solares que reflejan o dispersan esta radiación, lo malo que muchas personas pueden ser sensibles a los compuestos utilizados en esas formulaciones farmacéuticas. Hay que destacar que a pesar del daño que causa este tipo de radiación se la utiliza en tratamientos de fototerapia que ayudan a tratar males como la psoriasis.

Por último tenemos la radiación UV-A que se suele utilizar para que ciertas sustancias emitan fluorescencia haciéndolas visible al ojo humano. Debido a que no es constante la radiación en las longitudes de onda se la ha subdividido: en UV-AI que va de 340 a 400 nm y UV-AII que va de 320 a 340 nm dando como resultado ésta última como más perjudicial. El 95% de radiación UV que llega a la superficie terrestre es la UV-A por lo que al estar en contacto prolongado con la misma va a traer problemas en la piel pues es la que más profundidad en ella alcanza. Por este motivo se realizan diferentes estudios especialmente de extractos de plantas para desarrollar nuevos productos que contrarresten ésta radiación que de no tener precaución puede llevar al fotoenvejecimiento y carcinogénesis (Goldsmith et al., 2012, pp. 1031-1039).

1.3.4. Cantidad de Radiación UV Solar Recibida

En lo que respecta a la cantidad de radiación solar que recibimos diariamente, está compuesta de muchos factores que determinarán la forma de protegernos al entrar en contacto con ella.

Primeramente intensidad de los rayos solares varía en dependencia de la zona en la que se habite, por ejemplo es mucho mayor en la zona ecuatorial y mientras más se acerque a los polos, menor es la cantidad recibida, esto es conocido como latitud. En segundo lugar tenemos a la altitud pues a mayor altura mayor es la cantidad de radiación que recibimos y esto se nota en las quemaduras o eritemas que puede causar en la piel, en general el riesgo de sufrir efectos de los rayos UV aumenta.

Otro punto a tomar en cuenta es la cantidad de o espesor de la capa de ozono pues no es lo mismo en toda la superficie del planeta, sabemos que esta capa nos protege de la radiación solar pues la

absorbe pero en ciertos lugares por la falta de la misma o por menor cantidad los rayos UV del sol pasan libremente causando daños a los seres vivos.

Seguidamente podemos añadir que la hora del día también es un factor a tomar en cuenta pues esta determina la cantidad de radiación que entrará en contacto con la superficie terrestre, por ese motivo estudios han determinado que de entre las 11h00 a las 16h00 la radiación es mucho mayor.

Además la estación del año en que nos encontremos incide directamente con la cantidad de radiación absorbida pues si es en verano los rayos solares caen mucho más perpendicularmente sobre la superficie terrestre que en otras épocas del año. No olvidemos la reflexión de la radiación pues en lugares donde hay presencia de nieve es reflectada y de igual manera por la arena, por lo que hay que tomar precaución. Otro punto a tomar en cuenta son los efectos atmosféricos que pueden presentarse en distintos lugares como por ejemplo la humedad, un cielo nublado, entre otros; los cuales no nos permiten percatarnos de la presencia de los rayos solares llevándonos a una sobreexposición que desencadenará en efectos a corto o largo plazo.

La cantidad de radiación UV que entra en contacto con el ser humano proviene principalmente del sol pero no hay que olvidarse de los instrumentos médicos, instrumentos como lámparas UV usadas en investigaciones y para purificación de agua o aire por ser letal para los microorganismos; por esta razón habrá de tener mucho cuidado al momento de estar largos periodos expuestos a la luz UV solar o instrumentos que generen radiación. Aunque la radiación solar es peligrosa el hombre se las ha ingeniado para utilizarla en su beneficio como es las plantas eléctricas que utilizan la energía solar captada por los llamados paneles solares, también hay la energía hidroeléctrica que no sería posible sin que los rayos solares no evaporaran el agua para posteriormente condensarse en las alturas; aunque la utilización de esta energía no se ha generalizado, cada vez más hay nuevos proyectos que la toman en cuenta (Zubeldia et al., 2012, pp. 207-213).

1.3.5. Fotobiología Cutánea

Los rayos UV provenientes del sol al interactuar con los organismos vivos van a producir cambios en ellos. Cuando la luz solar entra en contacto con la piel es dispersada o absorbida a través de unas moléculas llamadas cromóforos que va a generar una respuesta fotobiológica.

A menor longitud de onda mayor es el efecto fotobiológico producido en la piel, las longitudes de onda que ocasionan eritemas o carcinomas están en el rango de la radiación ultravioleta B, mientras que la ultravioleta A es aproximadamente 1000 veces menos eficaz que la anterior. Ciertos tipos de fármacos o tintes utilizados pueden llegar a ocasionar fotosensibilidad al contacto con la luz solar, estas reacciones están mediados por especies reactivas de oxígeno. La causa por

la que produce eritemas es que al contacto de la piel con radiación UV-B las prostaglandinas y óxido nítrico intervienen siendo los mediadores. La radiación UV también es inmunosupresora y los que intervienen en este mecanismo son primeramente la formación inducida de dímeros de pirimidina, especies reactivas de oxígeno y ácido urocánico por la UV, le siguen la interleucina-10 (IL-10), activadores de plaquetas, radicales libres, lípidos oxidados. Ahora las células de Langerhans, queratinocitos, macrófagos, y linfocitos T son las células que principalmente al entrar en contacto con radiación UV intervienen en la inmunosupresión, dañando a los linfocitos T1; cuando es absorbida por los cromóforos la radiación UV también desencadenan una serie de reacciones que conllevan a la aparición de los daños en la piel como mutagénesis, toxicidad, carcinomas melanomas, eritemas (ver Figura 1-1). También se destaca la utilidad de la radiación UV en la producción cutánea de vitamina D en longitudes de onda que van de 295 a 300 nm, son esenciales para tener una buena salud y un sinnúmero de beneficios (Goldsmith et al., 2012, pp. 1031-1039).



Figura 1-1: Vía desde la absorción de la luz hasta los efectos biológicos observables.

Fuente: Mirelis, 2000.

1.3.6. Variación de la Reactividad Solar en Personas Normales

Personas al estar en contacto con la radiación UV no son capaces de desarrollar bronceado y esto se debe a que tienen limitada cantidad de melanina, generalmente son personas con piel de color blanco o blanco pálido. El color de piel tiende a dividirse en: blanco, marrón y negro; no todas las personas en el mundo tienen la capacidad de desarrollar bronceado y de ahí viene la clasificación del tipo de piel o fototipos de piel (ver Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Fototipos cutáneos (SPT)

| SPT | Color Básico de la Piel | Respuesta a la exposición |
|-----|-------------------------|----------------------------------------|
| I | Blanca Pálida | No se broncea, eritema solar fácil |
| II | Blanca | Bronceado difícil, eritema solar fácil |
| III | Blanca | Bronceado tras eritema solar |
| IV | Tostada | Bronceado fácil |
| V | Morena | Bronceado fácil |
| VI | Negra | Se hace más oscura |

Fuente: Zubeldía, 2000.

El fototipo de piel difiere en diferentes colores básicos de piel y de éste depende si una persona mucho más propenso a la quemadura del sol o a desarrollar bronceado. Las personas con fototipo de piel STP I o II son los que tienen mayor problema con el bronceado y generalmente sufren eritemas o quemaduras de piel, se los considera melanocomprometidos y los de fototipo STP II o IV melanocompetentes ya que pueden asimilar mejor la absorción de radiación UV. Las personas que tienen el SPT I son de piel blanca o pálida con cabello rubio, pelirrojo, ojos azules aunque también puede haber con cabello castaño, oscuro y ojos de color marrón. Las de SPT II vienen a ser un subgrupo de las SPT I, también se queman con facilidad, las de SPT III pueden a llegar a tener quemadura solar a un corto contacto con el sol pero su piel ya genera bronceado. En los EE.UU. se estima que aproximadamente el 25% de los habitantes son de SPT I Y II. En lo que respecta al SPT IV pueden llegar a ser personas con cabello rubio y de ojos azules, pero es mucho más frecuente a personas con cabello castaño, de ojos marrones y cuya piel es de color marrón claro. Por últimos tenemos a personas con SPT V con un color de piel morena y SPT VI con piel negra, que incluso pueden llegar a tener una quemadura en dependencia de la cantidad de radiación UV absorbida y del tiempo de exposición (Wolff y Johnson, 2009, pp. 232-244).

1.3.7. Efectos de la Radiación Solar en la Piel

Los efectos en la piel producto de la exposición a la radiación solar desencadenan fotorreacciones a longitudes de onda de 290 a 760nm.

Como se dijo anteriormente la radiación UV es precursora de vitamina D que se produce en la epidermis a partir del 7 dehidrocolesterol. Al entrar en contacto con la piel desencadena dos mecanismos, el primero es Fototraumático que viene a ser la respuesta del individuo en dependencia de cantidad absorbida y también depende del fototipo de piel, como resultado puede ser eritema, cuando es más crónica la exposición puede llegar a producir daño actínico crónico desencadenando en un carcinoma.

Dentro de la absorción de radiación se caracteriza por ser absorbida o reflejada por ciertos compuestos moleculares como la queratina a longitudes de onda menores a los 300nm, un aspecto negativo es que permite el paso de radiación UV-A y luz visible. Existe una capa llamada Malpighi donde es absorbida la radiación tanto A como la B pero tan solo en un 20% para la primera y 10% de la visible. La radiación ultravioleta penetra en la piel a niveles diferentes primero la UV-C, seguido la UV-B, luego la UV-A y por último la Visible (ver Figura 2-1).

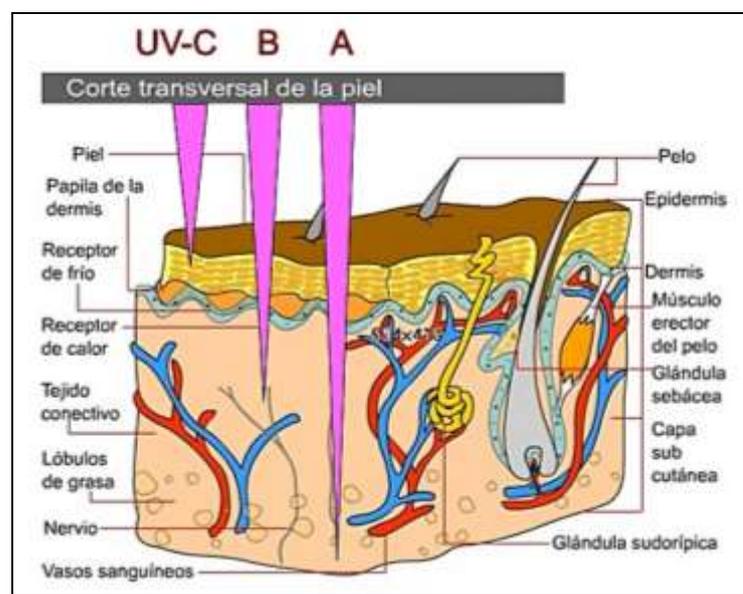


Figura 2-1: Penetración de la radiación UV en la piel

Fuente: Gramsch, 2011.

Para que desencadenen las reacciones tienen que penetrar hasta la dermis llegando a producir diferentes cambios a nivel fisiológico y otro tipo de reacciones anormales, claro está que depende de diferentes factores como la altitud, estación del año, ubicación geográfica; siendo las personas con STP I las más propensas a alteraciones de origen actínico. La melanina que es producida en

rangos de longitud de ondas que van desde los 300 – 700nm tiene diferentes tipos de funciones como absorción, protección, reflexión, bronceado y captación de esta para convertirlo en calor. El segundo mecanismo es la fotosensibilidad que se lleva a cabo por la excitación de reactivos en las moléculas absorbentes de energía provocando diferentes reacciones biológicas en el organismo que se pueden ver claramente reflejados en la piel (ver Tabla 3-1) (Alonso, 2000, pp. 126-131).

Tabla 3-1. Clasificación simplificada de reacciones de la piel a la luz solar

| |
|------------------------------------------|
| La fototoxicidad |
| Quemadura del sol |
| Drogas / inducido por productos químicos |
| Inducida planta (fitofotodermatitis) |
| Fotoalergia |
| Drogas / inducido por productos químicos |
| Dermatitis actínica crónica |
| Urticaria solar |
| Idiopática |
| Erupción polimorfa lumínica |
| Prurigo actínico |
| Hydroa vacciniforme |
| Metabólico y nutricional |
| Porfiria cutánea tarda |
| Variegata porfiria |
| Protoporfiria eritropoyética |
| Pelagra |
| Fotodermatosis de ADN deficiente |
| Xeroderma pigmentoso |
| Otros síndromes raros |
| Dermatosis fotoexacerbada |
| Fotodaño crónica |
| Dermatoheliosis (fotoenvejecimiento) |
| Lentigo solar |
| La queratosis actínica |
| El cáncer de piel |

Fuente: Wolff y Johnson, 2009.

Clasificación de la radiación en función de los daños que producen a la piel:

- Radiación UV-A: Son los que recibimos en mayor cantidad y penetran a la epidermis provocando daños a corto o largo plazo, están involucrados en la mutagénesis ya que afectan al ADN, generalmente causan daños a largo plazo como las arrugas aunque están asociados a carcinomas.
- Radiación UV-B: No penetran tan profundamente en la piel pero lo suficiente para ser considerados muy peligrosos de hecho mil veces más que la UV-A, causan daños directos en el ADN, eritemas, y están asociados a los cánceres de piel.
- Radiación UV-C: Esta radiación es la más fuerte y podría causar serios daños en la piel, afortunadamente es absorbida completamente en la capa de ozono y por lo tanto no hay riesgo de contraer cáncer de piel, aunque la radiación UV-C no llega a la superficie terrestre, existen instrumentos o equipos que pueden generarla como soldaduras, lámparas de mercurio, entre otros, por lo que se debe tener la debida precaución al utilizarlos (Society American Cancer, 2014).

1.3.8. Fotodermatosis

La fotodermatosis son diferentes tipos de enfermedades que afectan a la piel que puede ocurrir por ser muy sensibles a la radiación ya sea UV, Visible o IR, existen daños directos como quemadura solar, envejecimiento prematuro de la piel entre otras, también puede ocurrir daños indirectos como fototoxicidad, fotoalergia, en general un sinnúmero de afecciones a la piel (ver Figura 3-1) (De Argila et al., 2012, pp. 1-3).

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Idiopáticas (o inmunológicamente mediadas)</p> <ul style="list-style-type: none"> Erupción polimorfa lumínica <i>Hidroa vacciniiforme</i> Urticaria solar Dermatitis crónica actínica Prurigo actínico <p>Fotodermatosis inducida por agentes químicos</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Exógenas</i> <ul style="list-style-type: none"> Fototoxicidad Fotoalergia <i>Endógenas</i> <ul style="list-style-type: none"> Porfirias cutáneas <p>Defectos en la reparación del DNA</p> <ul style="list-style-type: none"> Xeroderma pigmentoso Síndrome de Cockayne Síndrome de Bloom Síndrome de Rothmund-Thompson Síndrome de Kindler Tricotiodistrofia <p>Dermatosis fotoagravadas</p> <ul style="list-style-type: none"> Lupus eritematoso Dermatomiositis Rosácea Psoriasis Dermatitis seborreica Dermatitis atópica Penfigoide ampolloso Pénfigo foliáceo Enfermedad de Darier Otras |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Figura 3-1. Clasificación de las fotodermatosis

Fuente: De Argila, 2012.

1.3.9. Cáncer de Piel

En nuestro país la incidencia de cáncer de piel va en aumento, esto es por consecuencia de las altas dosis de radiación que recibimos diariamente mucho mayor a los niveles considerados como máximo tolerables en humanos según datos de la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA), a nivel local en Riobamba el UVI está entre 14 a 15 (Agencia Espacial Civil Ecuatoriana, 2008).

Según datos de SOLCA Quito y Guayaquil la incidencia del cáncer de piel va en aumento y ya que la población tiene poco conocimiento sobre éste tema se exponen cada vez más incrementando este índice que en 2010 las mujeres con cáncer de piel no melanoma fue de 22,81% y varones con 27,81%; Quito con 6,82% mujeres y 13,67% varones; en la Amazonia en el 2008 el 8,9% para mujeres y 18,5% en los varones colocándose en el quinto lugar (SOLCA Quito, 2014).

En los EE.UU., se detectan más de un millón de carcinomas (no melanoma) anualmente, pero el melanoma ha adquirido mayor impulso tanto que el 2006 se ha registrado 62190 casos y 7910 muertes producto de este mal. En México aunque no está en las causas de muertes principales ya se va abriendo paso. El incremento de casos de cáncer no solo se debe al estilo de vida sino también a la disminución de la capa de ozono (Pinedo et al., 2006, pp. 263-264).

El cáncer de piel es un mal muy común en personas de piel blanca, se puede desarrollar en cualquier capa de piel y la principal causa de es la sobreexposición a la radiación solar, normalmente aparece en la edad adulta ya que la radiación UV causa mutaciones en el ADN, estas anomalías genéticas se van acumulando a lo largo de los años desde la niñez. Las personas que presenten ulceraciones, irritaciones de la piel, aparición de lunares, crecimiento o deformación de los mismos deben estar muy atentos porque puede desencadenar en cáncer de piel (Cazorla, 2013, pp. 1-36).

1.3.9.1. Tipos de Cáncer de Piel

1.3.9.1.1. Carcinoma de células basales

Este tipo de cáncer es el mayor se diagnostica pues suele afectar en su mayor parte a los varones y su nombre deriva por su parecido a estrato basal de la epidermis visto por microscopio. En los EE.UU se reportan 146 casos por cada 100 mil habitantes, claro que depende del tipo de piel y del país que provenga, pero en Australia se reportan 726 casos por cada 100 mil habitantes y las cifras siguen aumentando. Aunque generalmente se da en los hombres, en los últimos años ha incrementado la cifra para las mujeres con este mal, especialmente en Ecuador que cada vez más aumenta el índice de cáncer de piel. Como principal causa para la aparición del cáncer de piel es la radiación UV que proviene del sol ya que provoca inmunosupresión desencadenando un sinnúmero de eventos inmunológicos como el incremento del flujo de células inflamatorias producto de la alteración de las células de Langerhans (ver Figura 4-1).

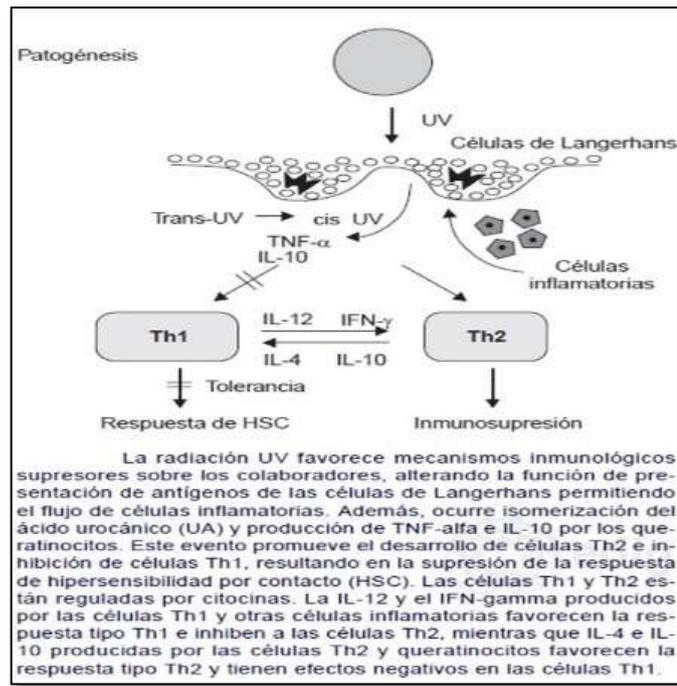


Figura 4-1: Efectos inmunosupresores de la radiación UV

Fuente: Gutiérrez, 2003.

Pero esta no es la única forma de desarrollo de este tipo de cáncer, también está la predisposición genética, la mutación del gen supresor P-53 que es la más común en los casos de carcinoma basocelular, otros factores pueden ser el contacto a radiaciones como camas de bronceado, lámparas que generan radiación UV-A o B, entre otros. Aunque este tipo de cáncer no se propaga con rapidez es invasivo localmente y de no tratarse pronto puede llegar a los huesos, además hay la posibilidad de que reaparezca una vez curado (Gutiérrez, 2003, pp. 166-171).

1.3.9.1.2. Carcinoma de células escamosas

Este tipo de cáncer es el segundo seguido de carcinoma basocelular, éste comienza o se desarrolla en las células de la epidermis o sus anexos de ahí se deriva su nombre. El carcinoma escamocelular es poco común pero provoca metástasis si no se trata a tiempo, puede seguir penetrando en las capas de piel invadiendo órganos, generalmente se presenta en las manos, mucosas, las plantas de los pies, o también por la queratosis actínica. La causa para que se aparezca es la exposición a radiación UV que generalmente es del sol, inmunosupresión, personas con el VIH, personas que han tenido contacto por largo tiempo con hidrocarburos, el tabaquismo, el tipo de piel (America Society Cancer, 2014).

1.3.9.1.3. El melanoma

Este melanoma es el menos común aunque el más peligroso porque causa el 75% de muertes por cáncer de piel. Es altamente invasivo ya que puede producir metástasis, además es una neoplasia de los melanocitos por lo que su rápido diagnóstico y detección es de gran importancia para la supervivencia del paciente dado que si no es detectado a tiempo disminuye prolongada y rápidamente la esperanza de vida, generalmente ocurre por predisposición genética, la exposición muy frecuente a la radiación solar u otro tipo de radiaciones generados por equipos, padecer de VIH u otro tipo de virus; por este motivo hay que tomar las medidas necesarias para protegerse del sol especialmente si las personas pertenecen al STP I o II que son los más propensos (Gutiérrez, 2003, pp. 166-171).

1.3.10. Fotoprotección

- ↪ Evitar la sobreexposición a los rayos UV del sol que generalmente son más intensos de entre las 11 am hasta las 4pm.
- ↪ Protegerse usando ropa que cubra la mayor parte de la piel como son camisas manga larga, uso de gorras o sombreros, gafas que desvíen los rayos UV para protegerse la vista.
- ↪ Proteger rigurosamente a los niños pues son más propensos ya que la mayor parte del tiempo suelen pasar al aire libre.
- ↪ Usar cremas contra la radiación solar que nos protejan de la radiación UV-A como de la UV-B, además deben ser de acuerdo al tipo de piel, la selección del SPF (Factor de protección solar) depende estrictamente de la latitud en la que nos encontremos así como de la altitud.
- ↪ En caso de realizar viajes de recreación a lugares como la playa, o a lugares altos con nieve estar bien protegido por su protector solar aplicándolo unos 30 minutos antes de exponerse al sol y volviéndose aplicar cada 3 horas, esto debido a que el agua y la nieve y la arena reflejan la radiación solar.
- ↪ En caso de consumir medicamentos notificar al médico para verificar si pueden producir fotosensibilidad y tomar las medidas necesarias.
- ↪ Minimizar la aplicación de perfume en caso de exponerse prolongadamente al sol.
- ↪ Usos de fotoprotectores tópicos.
- ↪ Por última instancia evitar o reducir la exposición solar (Zubeldia et al., 2012, pp. 207-213).

1.3.11. Fotoprotección Natural de la Piel

Nuestro organismo cuenta con muchas barreras de defensa cuando es atacado y la piel no es una excepción, ya que cuenta con mecanismo propio de fotoprotección y lo realiza de la siguiente manera (Hay que destacar que los niños cuentan con menor protección natural por lo que no se encuentran bien desarrollados y hay que utilizar fotoprotectores artificiales por seguridad):

- ↳ La hiperqueratosis.- que es engrosamiento del estrato corneo de la piel.
- ↳ La melanogénesis.- que es la síntesis y distribución de melanina en toda la piel especialmente en lugares que se encuentran con mayor exposición al sol.
- ↳ Ciertos sistemas enzimáticos, las vitaminas y oligoelementos que actúan para desactivar radicales libres ocasionados por el contacto de la piel con la radiación UV.
- ↳ Un sistema de reparación del ADN, por medio de algunas enzimas (Sociedad Argentina de Dermatología, 2012).

1.3.12. Filtros solares

Son sustancias que tienen la finalidad de protección contra la radiación UV y reducir el riesgo de desarrollar alguna patología como fotodermatosis, cáncer de piel, eritemas. Las sustancias deben ser muy seguras que no produzcan reacciones adversas como alergias, y se destaca el ZnO, TiO₂, FeO₂, MgO₂, entre otros; son muy estables y otorgan protección contra la radiación UV pero si la cantidad aplicada a la piel supera el 5% se formará una capa de color blanco que estéticamente no suele ser de agrado.

1.3.13. Clasificación de los Filtros Solares

1.3.13.1. Filtros físicos

Son partículas microscópicas que tienen la finalidad de reflejar y difundir la radiación UV-A y B, aunque también lo hacen con la IR y visible; porque produce un efecto pantalla.

1.3.13.2. Filtros químicos

Son sustancias solubles con origen sintético, tienen propiedad cromófora ya que absorbe los fotones a explícitas longitudes de onda. Sirven de gran protección contra la radiación UV aunque algunas personas suelen ser alérgicas a estas moléculas. Entre los más importantes filtros químicos se encuentra el PABA, benzofenonas, cinamatos, entre otros.

1.3.13.3. Filtros Biológicos

Son sustancias con propiedad antioxidante como la vitamina A, la vitamina E que para poder aplicarlos se emplean en forma de acetato o palmitato con el fin de aumentar la protección contra los rayos UV y al mismo tiempo que fortalecer al sistema inmunológico de la piel (Esteva, 2005, p. 70).

1.3.14. Factor de protección solar (SPF)

Este factor de protección solar nos permite conocer el número de veces que la sustancia fotoprotectora aumenta la capacidad de defensa natural de la piel frente al eritema antes de que ocurra una quemadura solar. Un mayor número de SPF indica que su protección contra los rayos UV del sol es mejor, un ejemplo de esto es si nos untamos protector solar de SPF 30, significa que por cada treinta minutos de exposición al sol, apenas se ha recibido un minuto de radiación ultravioleta B. Pero esto varía claramente con el SPF que contenga el protector solar, la cantidad que se utilice y la forma en cómo se utilice (America Society Cancer , 2014) (ver Tabla 4-1, 5-1).

Cuadro 4-1: Clasificación del Factor de Protección Solar (SPF) (COLIPA)

| Categoría | Factor de Protección Solar (SPF) |
|------------------|-----------------------------------------|
| Bajo | 2-4-6 |
| Medio | 8-10-12 |
| Alto | 15-20-25 |
| Muy Alto | 30-40-50 |
| Ultra | 50 o > |

Fuente: Sociedad Argentina de Dermatología, 2012.

Tabla 5-1: Clasificación del Factor de Protección Solar (SPF) (FDA)

| Categoría | Factor de Protección Solar (SPF) |
|-------------------|-----------------------------------------|
| Mínima | 2-4 |
| Moderada | 4-8 |
| Alta | 8-12 |
| Muy Alta | 12-20 |
| Ultra Alta | 20-30 |

Fuente: Sociedad Argentina de Dermatología, 2012.

1.3.15. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que tienen como función retrasar el sistema de auto-oxidación inhibiendo la formación de radicales libres o eliminarlos de nuestro organismo. En lo que se refiere a la oxidación celular se destaca que es un proceso normal pero que puede traernos ciertos beneficios como protección ante las infecciones y eliminación de organismos patógenos que pudieran perjudicar nuestra salud. El problema está en el exceso de estos radicales libres y que nuestro cuerpo no pueda asimilarlos o eliminarlos, de ahí salen las complicaciones como envejecimiento prematuro u otras anomalías; el exceso de radicales libres también se debe a nuestros malos hábitos alimenticios, exceso de alcohol, drogas, el mismo estrés y la contaminación del medio ambiente. La eficacia de un antioxidante se relaciona con la energía de activación que puede producir, constantes de velocidad, el potencial de oxidación-reducción, la facilidad con la que el antioxidante se pierde o destruye, y por último la solubilidad, también está dado por su capacidad de interrumpir la reacción en cadena de radicales libres donando un protón H^+ convirtiéndose a sí mismos en radicales libres; los antioxidantes pueden ser de origen sintético como (BHA, BHT, y galato de propilo) y naturales los cuales contiene compuestos fenólicos o anillos aromáticos (Brewer, 2011, pp. 221-227).

1.3.16. Antioxidantes Naturales

Los antioxidantes naturales surgen gracias a que diferentes tipos de plantas las sintetizan para eliminar los radicales libres, generalmente eso sucede a aquellas que se encuentran bajo constante

estrés oxidativo, especies reactivas de O_2 , pro-oxidantes que pueden ser productos exógenos como la luz y el calor; endógenos como peróxido de Hidrógeno y metales de transición. La efectividad de los antioxidantes depende de la capacidad de absorción de radicales de O_2 (ORAC), para ello existen compuestos derivados de plantas como carnosol, rosmanol, rosmariquinona y rosmaridifenol que llegan a tener un mejor poder antioxidante que el BHA. Dentro del grupo de antioxidantes naturales tenemos a los antioxidantes fenólicos que se dividen en: ácidos fenólicos (protocatéuico, caféico, rosmarínico, gálico) (ver Figura 5-1). En segundo lugar están diterpenos fenólicos que pueden ser el carnosol y ácido carnosólico. Seguido van los flavonoides representados por quercetina y catequina. Los aceites vegetales también están dentro de un cuarto grupo compuesto por eugenol, carvacrol, timol, mentol. Todos ellos pueden actuar favorablemente contra los radicales libres e incluso los flavonoides pueden actuar eliminándolos del organismo (Brewer, 2011, pp. 221-227).

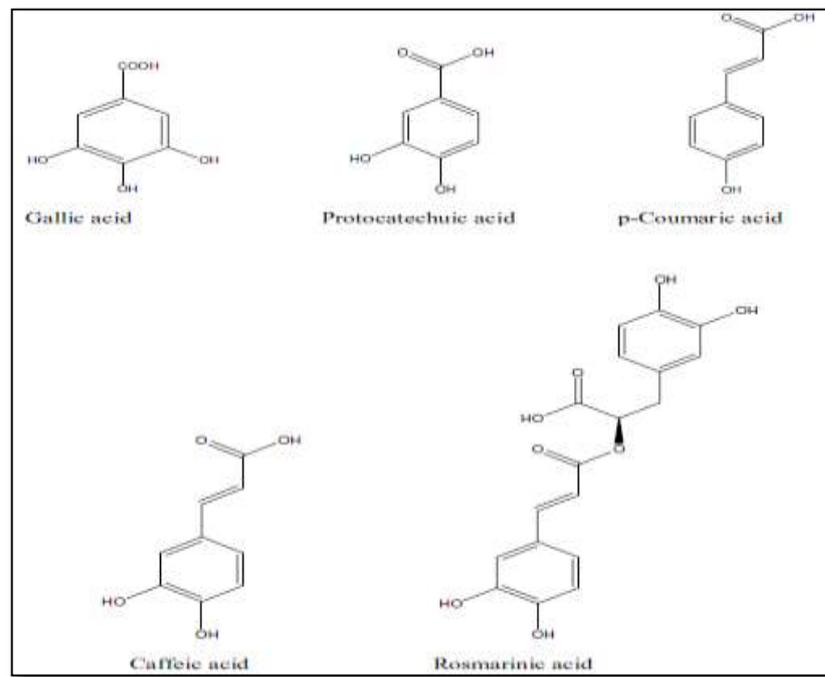


Figura 5-1: Ácidos antioxidantes fenólicos

Fuente: Brewer, 2011.

1.3.17. Flavonoides en Vegetales y su Función

Son compuestos sintetizados por las plantas que ayudan a protegerse de los radicales libres, la radiación UV, se sintetizan a partir de la fenilalanina y de tres moléculas de malonil-CoA. Impiden los efectos nocivos que podrían poner en riesgo a la planta, también son sintetizados como defensa personal pues tienen un sabor desagradable que les ayuda a protegerse de los herbívoros, normalmente suelen situarse en la capa superficial de la planta. Las estructuras de

los antioxidantes flavonoides se los pueden apreciar en: (ver Figura 6-1) (Cazorla, 2013, pp. 1-36).

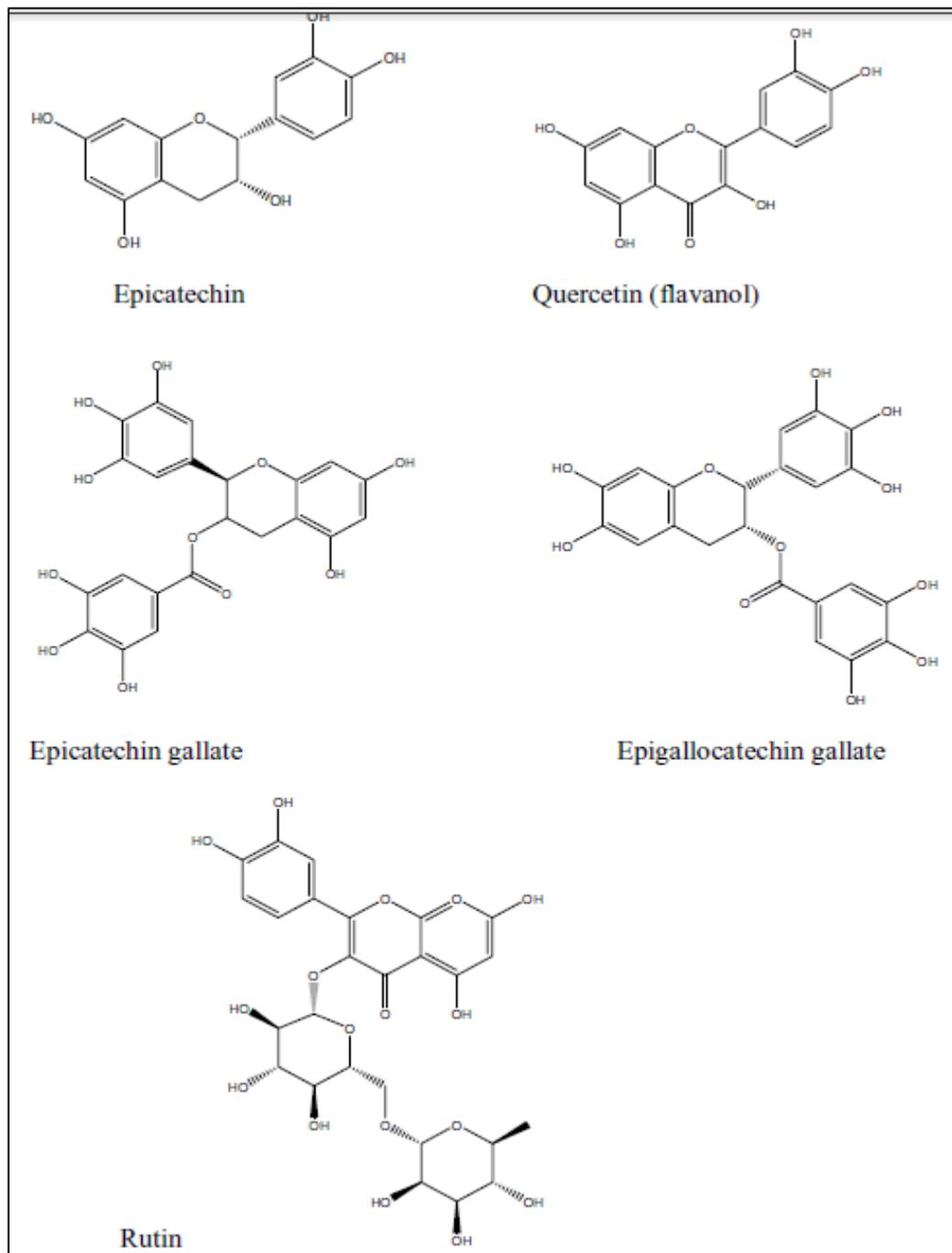


Figura 6-1: Antioxidantes flavonoides

Fuente: Brewer, 2011.

1.3.18. Cacho de Venado (*Halenia weddeliana* Gilg)

Clasificación científica

Reino: Plantae

Orden: Gentianales

Familia: Gentianaceae

Género: *Halenia*

Especie: *Halenia weddeliana* Gilg



Figura 7-1: *Halenia weddeliana* Gilg

Fuente: Sinmaleza Johnny, 2015.

(FREE AND OPEN ACCESS TO BIODIVERSITY DATA, 2013).

1.3.18.1. Descripción Botánica “Características”

Es una hierba terrestre de hasta unos 20 centímetros de altos, la base de la planta es leñosa y posee un ciclo de vida anual, además posee tallos subterráneos por lo que hay que tener mucho cuidado al extraerlas, tienen ramas superficiales que generalmente posee pocas hojas pues son muy largas, las flores son una especie de cacho de ciervo o venado de donde se deriva el nombre común, aunque en los pueblos kechwas la conocen como Taryga yuyu, las flores son de color amarillo un poco verdoso (Aguilar et al., 2009, p. 28).

1.3.18.2. Origen y Distribución

Su hábitat natural es subtropical o tropical cuyo rango de altitud va de 1000 a 3500 metros sobre el nivel del mar, pastizales de altura y praderas. Se distribuye en los páramos de Ecuador, Colombia y Perú (ENCYCLOPEDIA OF LIFE, 2013).

1.3.18.3. Propiedades Terapéuticas

Es una planta que aún no ha sido estudiada a profundidad por lo que no hay datos de su composición química pero especies diferentes de la misma familia poseen gran cantidad de compuestos fenólicos y antioxidantes. Es utilizada de diferentes maneras para tratar enfermedades como el reumatismo por decocción de la misma, las hojas, las flores y tallos suelen utilizarlos contra padecimientos mentales (Aguilar, et al., 2009, p. 28).

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de la Investigación

Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorio de Química Analítica e Instrumental y Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Recolección del Material Vegetal

Se procedió a recolectar en los alrededores de las Lagunas de Ozogoche, comunidad Totoras, cantón Alausí, Chimborazo-Ecuador. Puntos GPS (X= 766932; Y= 9750250; Z= 3780 m.s.n.m.).

2.3. Identificación Botánica y Taxonómica

Se tomaron cinco muestras de plantas que fueron prensadas y entregadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo cuyo responsable es el Ing. Jorge Caranqui.

2.4. Determinación del Contenido de Humedad

Es un método gravimétrico se realiza por desecación y para determinar se parte de 2 gramos de material vegetal triturado, se transfiere a una cápsula previamente tarada, posteriormente se procede a secar en la estufa por 3 horas a 105 °C. Una vez cumplido el tiempo se coloca la cápsula en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa; nuevamente se coloca la cápsula en la estufa por una hora y se repite el procedimiento hasta que el peso sea constante. Esta determinación se realizó por triplicado y posteriormente se realizó los cálculos (Aragadvay, 2009, p. 65).

Cálculos:

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

En el que:

M1: Representa la masa de la cápsula vacía.

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

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

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.5. Determinación de Cenizas Totales

Es un método gravimétrico y para esta determinación se procede a pesar 2 gramos de material vegetal triturado, se transfiere a un crisol de porcelana anteriormente tarado, se coloca en un reverbero para carbonizar la muestra y posteriormente se introduce en un horno mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo se coloca el crisol de porcelana en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; se coloca nuevamente en el horno mufla a 700 °C por media hora y se repite el procedimiento hasta que el peso sea constante. En caso de que se presente trazas de carbón en el residuo se le añade gotas de peróxido de hidrógeno, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio 10 mg en 100 mL y se procede a evaporar con la finalidad de que el residuo sea casi o de color blanco. Esta determinación se realizó por triplicado y posteriormente se realizó los cálculos (Aragadvay, 2009, p. 66).

Cálculos:

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

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

En el que:

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

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

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

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

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

H: Representa al porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.6. Determinación de Cenizas Solubles en Agua

Es un método gravimétrico en el que para la determinación a las cenizas totales se le añade 20 mL de agua destilada, se procede a tapar el crisol de porcelana y se hace hervir de manera suave por 5 minutos en un reverbero. En un papel filtro totalmente limpio se filtra la solución resultante y se lo coloca al crisol de porcelana inicial, posteriormente se carboniza en un reverbero y se incinera en un horno mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; el proceso se repite en intervalos de media hora hasta alcanzar un peso constante. Esta determinación se realizó por triplicado y luego se realizaron los cálculos (Aragadvay, 2009, p. 67).

Cálculos:

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

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

En el que:

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

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

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

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

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

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

H: Representa el porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.7. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

Es un método gravimétrico en el que para la determinación a las cenizas totales se le añade 20 mL de ácido clorhídrico al 10%, se procede a tapar el crisol de porcelana y se hace hervir de manera suave por 5 minutos en un reverbero. En un papel filtro totalmente limpio se filtra la solución resultante y se lava con agua destilada caliente hasta que al acidularle con ácido nítrico; al cual se procede añadir 2 gotas de nitrato de plata 0,1 M no presente muestras de cloruros y se lo coloca al crisol de porcelana inicial, posteriormente se carboniza en un reverbero y se incinera en un horno mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; el proceso se repite en intervalos de media hora hasta alcanzar un peso constante. Esta determinación se realizó por triplicado y luego se realizaron los cálculos (Aragadvay, 2009, p. 68).

Cálculos:

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

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

En el que:

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

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

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

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

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

H: Representa el porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.8. Tamizaje Fitoquímico

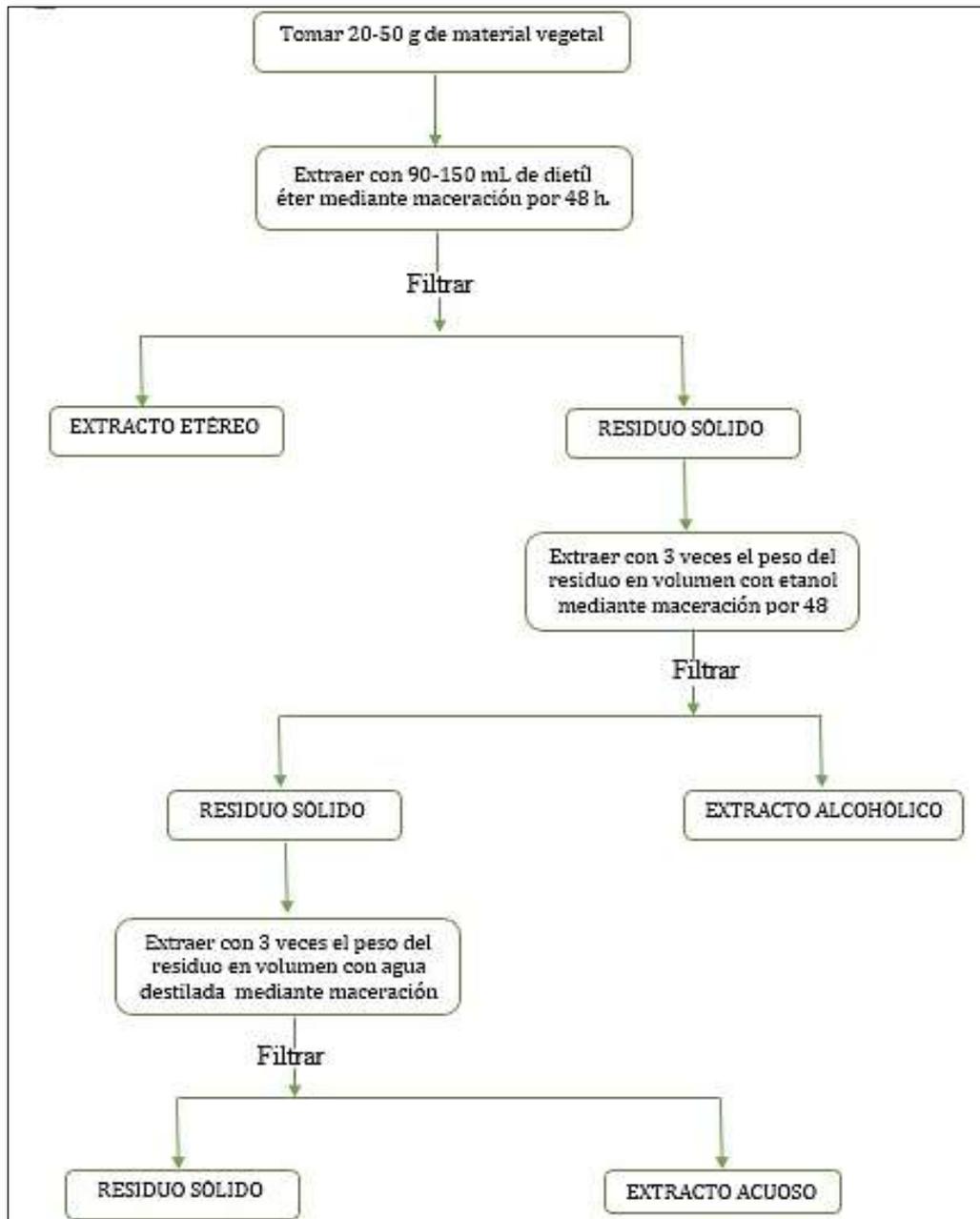


Figura 1-2: Técnica para el tamizaje Fitoquímico

Fuente: Miranda M., 2001.

2.9. Análisis Físicoquímicos Cualitativos

2.9.1. Reacciones de Caracterización

Para la realización de los ensayos se procedió de la siguiente manera:

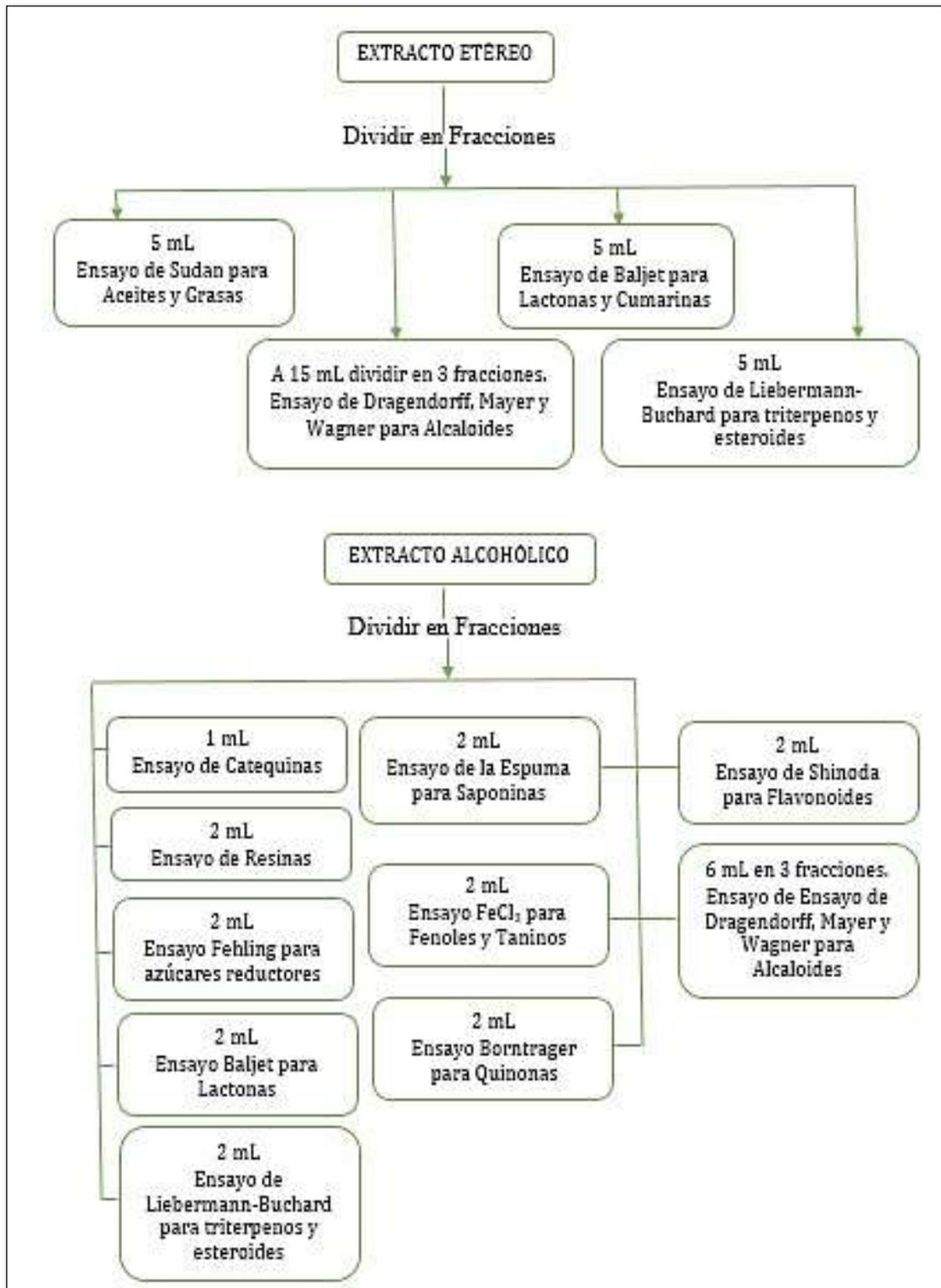


Figura 2-2: Técnica para el tamizaje Fitoquímico extracto etéreo.

Fuente: Miranda M., 2001.

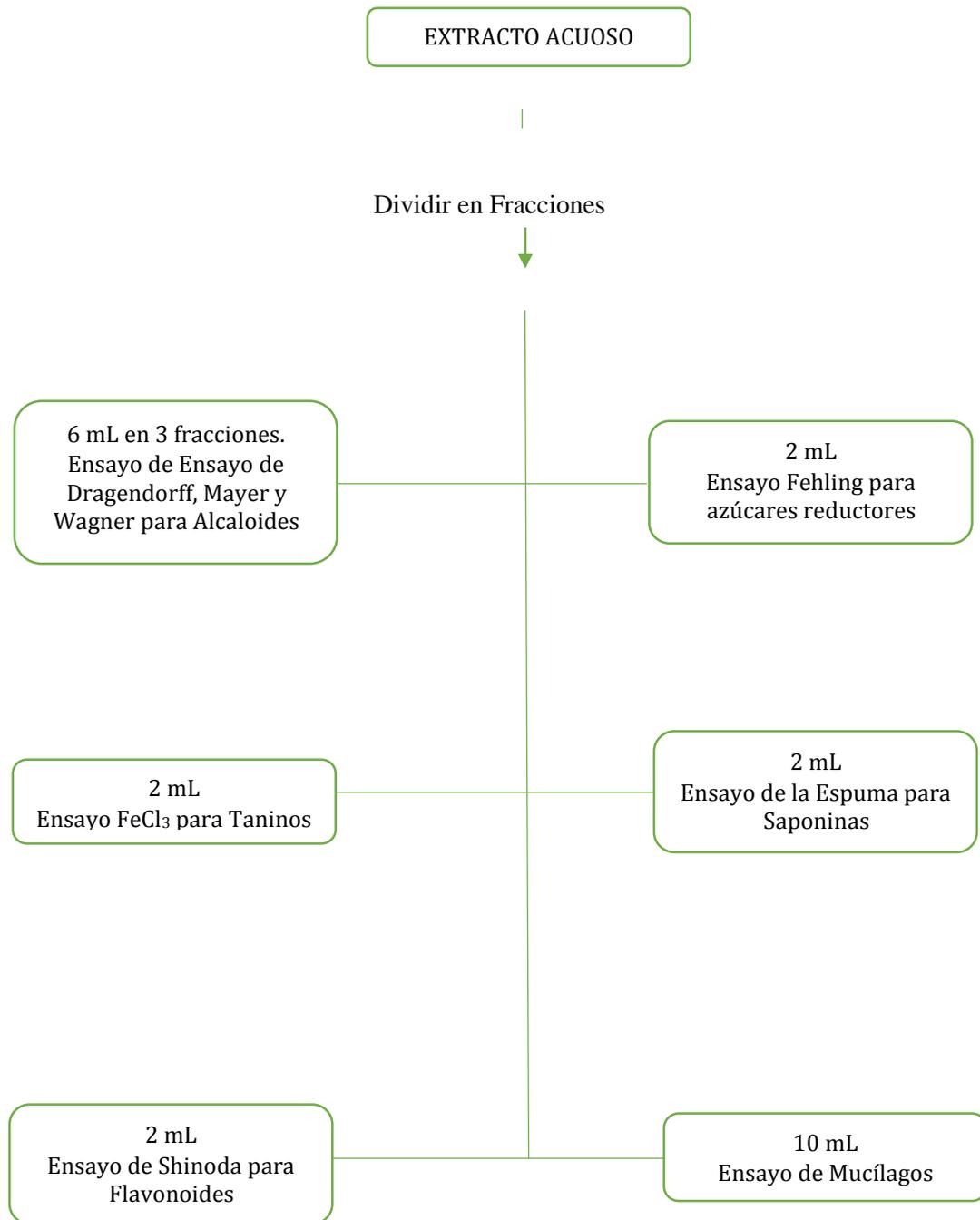


Figura 3-2: Técnica para el tamizaje Fitoquímico extracto acuoso.

Fuente: Miranda M., 2001.

2.10. Obtención del Extracto EtOH y Subextractos de *Halenia weddeliana* Gilg

Para obtención de los respectivos extractos de investigación, una vez recolectados los especímenes vegetales se procedieron a secarlos a temperatura ambiente protegido del sol para luego reducir el tamaño de partícula en un molino, se utilizó todas las partes del vegetal. A partir de 100 g de planta seca y molida se procedió a macerar en etanol al 70% protegido de la luz a temperatura ambiente por 72 horas y se filtró las clorofilas. Al extracto etanólico resultante se concentró a través de un rotavapor a 45 °C hasta sequedad, posteriormente fue suspendida en una mezcla de H₂O:MeOH (70:30) y se extrajo sucesivamente con Hexano, Cloroformo y Acetato de etilo en orden creciente de polaridad. A todas las fracciones de extracto se procedió a concentrar en rotavapor a 40 °C hasta sequedad las mismas que se utilizaron en la presente investigación.

2.11. Determinación del contenido de Fenoles Totales

- a) Una alícuota (40 µL) de un conveniente diluido de subextractos de Hexano, Cloroformo y Acetato de etilo, agregar 3,16 mL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y mezclar bien.
- b) Agitar la mezcla y dejar reposar durante 6 min, antes de añadir 600 uL de solución de carbonato de sodio, y agitar para mezclar.
- c) Las soluciones se dejaron a 20 ° C durante 2 horas y la absorbancia de cada solución se determinó a 765 nm frente a la absorbancia del blanco y la trama de la absorbancia vs. concentración.
- d) Contenidos fenólicos totales de los extractos se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo (mgGAE / g) a través de la curva de calibración con ácido gálico. El rango de la curva de calibración va de 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm y 150 ppm ($R^2 = 0,9957$).
- e) Todas las muestras se realizaron por triplicado (De Oliveira et al., 2013, pp. 122-127).

2.12. Determinación del contenido de Flavonoides Totales

- a) Una alícuota (0,5 mL) de un conveniente diluido de subextractos de Hexano, Cloroformo y Acetato de etilo, se mezcla con 2 mL de agua destilada.
- b) Añadir 0,15 mL de Nitrito de Sodio al 5 %.
- c) Seguidamente añadir 0,15 mL de Cloruro de Aluminio al 10 %, mezclar y dejar reposar por 6 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- d) Una vez cumplido el tiempo se añade 2 mL de Hidróxido de sodio al 4 %, mezclar y dejar reposar por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.

- e) La absorbancia de cada solución se determinó a 510 nm frente a la absorbancia del blanco y la trama de absorbancia vs. Concentración.
- f) El contenido de flavonoides totales de los extractos se expresaron como mg de equivalentes de quercetina por gramo (mgQE / g) a través de la curva de calibración de quercetina. El rango de la curva de calibración va de 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm y 10 ppm preparada en metanol ($R^2= 0,9991$). Se realizó por triplicado (Wu y Lean-Teik, 2008, pp. 323–330).

2.13. Determinación de Factor de Protección Solar (SPF) *in vitro*.

Para la determinación del SPF los extractos secos se diluyen en etanol 96%, luego se prepara una solución a 25 ppm. Posteriormente se realizó la exploración espectrofotométrica a longitudes de onda entre 290 a 320 nm, con intervalos de 5 nm a través de un espectrofotómetro UV cuyas dimensiones de la cubeta de cuarzo es de 1 cm y se utiliza el etanol 96% como blanco para esta determinación (Violante et al., 2009, pp. 252-253).

El cálculo del SPF de los diferentes extractos se obtuvo mediante la ecuación perfeccionada por Mansur en 1986:

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

En el que:

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

Los valores de EE X I son constantes y fueron determinados por (Sayre et al., 1979, pp. 559-566), y se muestra a continuación.

| Table. 2: Normalized product function used in the calculation of SPF | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Wavelength (nm) | EE x I (normalized) |
| 290 | 0.0150 |
| 295 | 0.0817 |
| 300 | 0.2874 |
| 305 | 0.3278 |
| 310 | 0.1864 |
| 315 | 0.0839 |
| 320 | 0.0180 |
| Total | 1.0000 |

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

Figura 4-2: Los valores de EE X I

Fuente: Sayre, 1979.

2.14. Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida

Una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) se cultivó en un caldo de infusión de cerebro/corazón, se procedió a cultivar en agar Mueller Hinton. Las bacterias se suspendieron en suero fisiológico 0,85% hasta alcanzar una concentración de $0,5 \times 10^8$ Escala Mcfarland, y se transfirieron a tubos de cuarzo (espesor 1 mm, capacidad de 4 ml). Cada extracto seco se disolvió en el disolvente apropiado (2 mg / ml) y se transfirió en un tubo de cuarzo. El tubo que contiene las bacterias se colocó detrás del tubo que contiene la sustancia fotoprotectora, formando una unidad experimental. Las unidades experimentales fueron irradiadas con una lámpara de UV-B y sembradas en agar Mueller Hinton (Philips, Broadband TL 40w/12 RS). Dosis de irradiación fue de $0,60 \text{ J / cm}^2$.

Se detectó el número UFC (Unidades Formadoras de Colonias) sobrevivientes de acuerdo con el método de dilución en diferentes períodos de tiempo. Las sustancias empleadas fueron subextracto hexánico, clorofórmico, con acetato de etilo (Acevedo et al., 2005, pp. 301-309).

Se utilizó dos controles positivos OMC (octil-metoxicinamato) y Pamidato-O. Los controles negativos fueron los solventes utilizados para disolver las sustancias fotoprotectoras.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

3.1.1. *Determinación del Contenido de Humedad*

Previa la utilización de la droga cruda es necesario realizar un control de calidad de la misma para determinar las óptimas condiciones para la presente investigación. En esta determinación se utilizó el método gravimétrico de secado en estufa de aire en el que se obtuvo un valor de $13,21\% \pm 0,04$ de contenido de humedad del cacho de venado (*Halenia weddeliana* Gilg) encontrándose dentro de los valores de referencia dados por la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos, Farmacopea Española 2002 y demás estudios similares en el que el límite es del 14% (Cazorla, 2013, pp. 1-36) (ver Tabla 1-3). El análisis del contenido de humedad viene a ser de gran importancia porque de tener un valor elevado la droga cruda debe ser rechazado por la mala estabilidad que puede presentar debido a proliferación de bacterias y hongos que pueden ocasionar pérdida de los metabolitos por la degradación e hidrólisis de los mismos, esto puede incurrir en una mala estabilidad en el producto final (Enríquez et al., 2008, p. 57).

3.1.2. *Determinación de Cenizas Totales*

Los resultados obtenidos en el análisis de cenizas totales fueron de $1,63\% \pm 0,17$ en base hidratada y $1,88\% \pm 0,19$ en base anhidra (ver Tabla 5-3), los cuales se encuentran por debajo de los límites establecidos por la Farmacopea Española 2002 que es máximo 5% (Guerrero, 2014, p. 33) y en comparación con estudios similares, naturalmente el valor en base anhidra es mayor por el poco contenido de humedad de la muestra. La determinación de este parámetro es de gran importancia debido a que representa la calidad del material vegetal en el que valores elevados suponen un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuados, gran cantidad de minerales, metales pesados y residuos inorgánicos como carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice, que puede surgir por contaminación o por la localización geográfica y características de la planta como por ejemplo la *Halenia weddeliana* Gilg presenta tallos subterráneos.

3.1.3. Determinación de Cenizas Solubles en Agua

En la presente determinación se obtuvo los resultados siguientes: $0,94\% \pm 0,17$ para base hidratada y $1,08\% \pm 0,2$ (ver Tabla 6-3), lo que demuestra que se encuentra dentro de los límites establecidos por la Farmacopea Española 2% y Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos con un valor máximo de 7% (Cazorla, 2013, pp. 1-36). Los resultados muestran un bajo contenido de cenizas solubles en agua lo que se interpreta en una menor cantidad de minerales y metales pesados o metales alcalinos en la droga cruda así como la no presencia excesiva de contaminación con restos inorgánicos que provienen del área de recolección, verificando así su óptima calidad para el presente estudio investigativo (Gualli et al., 2012, pp. 1-60).

3.1.4. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

Los resultados para este análisis fueron de $0,12\% \pm 0,02$ para base hidratada y $0,18\% \pm 0,02$ en base anhidra (ver Tabla 4-7), los mismos que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Farmacopea Española 2002 con un máximo de 1% y USP (2001) 5% (Cruz, 2009, pp. 98-99). Este parámetro indica que la muestra contiene muy poca cantidad de contaminación por sílice, principalmente la tierra silíceas y arena que se encuentran presentes en el entorno de la *Halenia weddeliana* Gilg, además de la poca cantidad de contaminación con productos térreos haciéndola apta para el presente estudio (Sharapin, 2008, pp. 146-150).

3.1.5. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico consiste en la identificación de la presencia o ausencia de los grupos funcionales o metabolitos secundarios apreciados colorimétricamente o por precipitación, es un método cualitativo. Método de gran importancia que radica en extraer los metabolitos secundarios por medio de extracciones con solventes de polaridad creciente como son: éter dietílico, etanol 70% y agua, éstos hacen que suceda un cambio de pH del medio y extraen los metabolitos de acuerdo a la solubilidad que presentan (Miranda y Cuéllar, 2001, pp. 141, 207, 291-292). A través del éter dietílico se extraen los componentes lipófilos en el caso de la *Halenia weddeliana* Gil se destaca la moderada presencia de lactonas y cumarinas, alta evidencia de triterpenos, esteroides, aceites y grasas (ver Tabla 8-3). Seguido con el etanol al 70% se extraen metabolitos secundarios afines a su polaridad (Villar, 1999, pp. 136-267), generalmente compuestos hidrófilos que en la *Halenia weddeliana* Gilg fue una moderada evidencia de lactonas y cumarinas, alta presencia de triterpenos, esteroides, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, quinonas, catequinas y flavonoides (ver Tabla 8-3). Al final el agua extrae los metabolitos con mayor polaridad y cabe resaltar que “es capaz de extraerlos en su forma ionizada” (Enríquez et al., 2008, p. 57). Los metabolitos

que fueron identificados con alta evidencia son azúcares reductores, saponinas, fenoles y taninos (ver Tabla 8-3). De esta manera se comprueba cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios que brindaron protección contra la radiación UV-B en el presente estudio. Finalmente se reporta la no presencia de alcaloides, resinas, mucílagos que podría ser por la poca o nula cantidad de estos metabolitos en el vegetal y debido a que el método cualitativo no es lo suficientemente potente para identificarlos.

3.1.6. Rendimiento y cantidad de los Subextractos de *Halenia weddeliana* Gilg

Mediante este parámetro determinamos la cantidad real expresada en porcentaje de extractos secos obtenidos por medio de extracciones con diferentes solventes; dando como resultado un rendimiento de 0,37% el subextracto hexánico con 0,201g; 0,65% el subextracto clorofórmico con 0,354g y 0,39% para el subextracto con acetato de etilo con 0,210g (ver Tabla 9-3). Estos subextractos secos fueron utilizados para realizar los diferentes análisis.

3.1.7. Análisis Cualitativo de los Grupos Fitoquímicos por TLC (Cromatografía en Capa Fina)

El presente análisis se realizó con la finalidad de determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el Extracto y Subextracto de *Halenia weddeliana* Gilg y para lo cual se utilizó sílica gel 60F₂₅₄ como absorbente y como sistema de solvente el Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: Metil isobutil cetona: Agua, en proporciones (7 : 0,7 : 0,3 : 2 : 1 v/v) y revelado UV-365nm (Fluorescencia de los flavonoides). Se obtuvo los siguientes Rf: En el subextracto hexánico con Rf=0,17 (Wagner y Bladt, 1996, pp. 146, 147, 190, 191). Estos metabolitos pueden ser responsable directos de la actividad fotoprotectora por sus propiedades antioxidantes (ver Tabla 1-3, 10-3).

Tabla 1-3: Extractos con su correspondiente Rf y metabolito identificado

| $Rf = \frac{X}{Y}$ | Extracto etanólico 96% | Subextracto Clorofórmico | Subextracto con acetato de etilo |
|--------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Manchas | | | |
| 1 | 0,13 | 0,13 | 0,13 |
| 2 | 0,26 | 0,28 | 0,26 |
| 3 | 0,33 | 0,33 | 0,32 |
| 4 | 0,43 | 0,43 | 0,42 |

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|
| 5 | 0,51 | 0,51 | 0,51 |
| <p>X= distancia recorrida por el compuesto.</p> <p>Y= distancia recorrida por el eluyente</p> | | | |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.1.8. Determinación del contenido de Fenoles Totales

En la presente determinación se realiza una curva de calibración de ácido gálico que va de 50 a 150 ppm (ver Figura 1-3), y se procede a verificar el contenido de fenoles totales expresados en mgEAG/g empleando la ecuación de la recta $A = 0,0015C - 0,0106$ (A= Absorbancia, C= concentración), despejando la fórmula se obtiene la cantidad de fenoles totales en ppm para una posterior multiplicación por el factor de dilución (Ochoa et al., 2013, p. 57). El ensayo se lo realiza mediante método de Folin-Ciocalteu útil para conocer la eficacia de la extracción de compuestos fenólicos en los diferentes solventes (Singleton et al., 1999, pp. 152-178) determinándose los valores promedio de $7,74 \pm 0,19$ mgEAG/g para el subextracto hexánico, $6,42 \pm 0,06$ mgEAG/g el subextracto clorofórmico y mayor concentración con $15,63 \pm 0,14$ el subextracto con acetato de etilo (ver Figura 2-3) (ver Tabla 11-3). La cantidad de fenoles totales obtenidos de la *Halenia weddeliana* Gilg representan una importante cantidad pero poco en relación a estudios semejantes (De Oliveira, et al., 2013, p. 102), cabe recalcar que la actividad antioxidante y fotoprotectora no siempre se correlaciona con la presencia de grandes cantidades de compuestos polifenólicos, esto se determina mediante los resultados obtenidos al evaluar las actividades farmacológicas como antioxidantes, fotoprotección, etc., (Ordoñez et al., 2006, p. 454). Los tejidos vegetales de la *Halenia weddeliana* Gilg contienen una amplia variedad de compuestos con actividad antioxidante como los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados, carotenoides y terpenos, entre otros, además que en su localización geográfica de 1000-3500 m.s.n.m. se encuentra en contacto directo con la radiación solar haciendo que el vegetal desarrolle metabolitos para protegerse de la misma poseyendo actividad fotoprotectora (Wu y Lean-Teik, 2008, p. 323-330), siendo estos metabolitos secundarios los responsables directos en la absorción de radiación UV-B por su acción inhibitoria de quimioluminiscencia otorgando fotoprotección en los ensayos determinados (Krol et al., 1996, pp. 19-25).

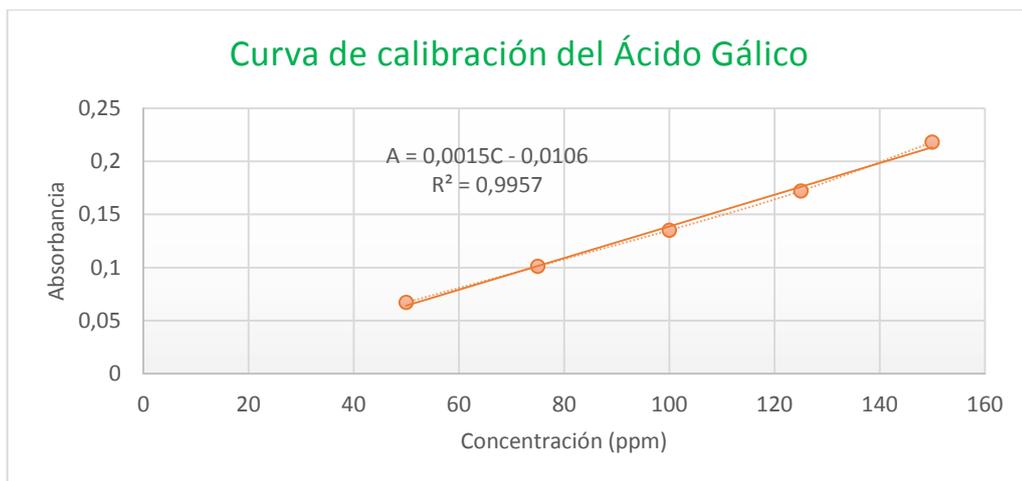


Figura 1-3: Curva de calibración del ácido gálico

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

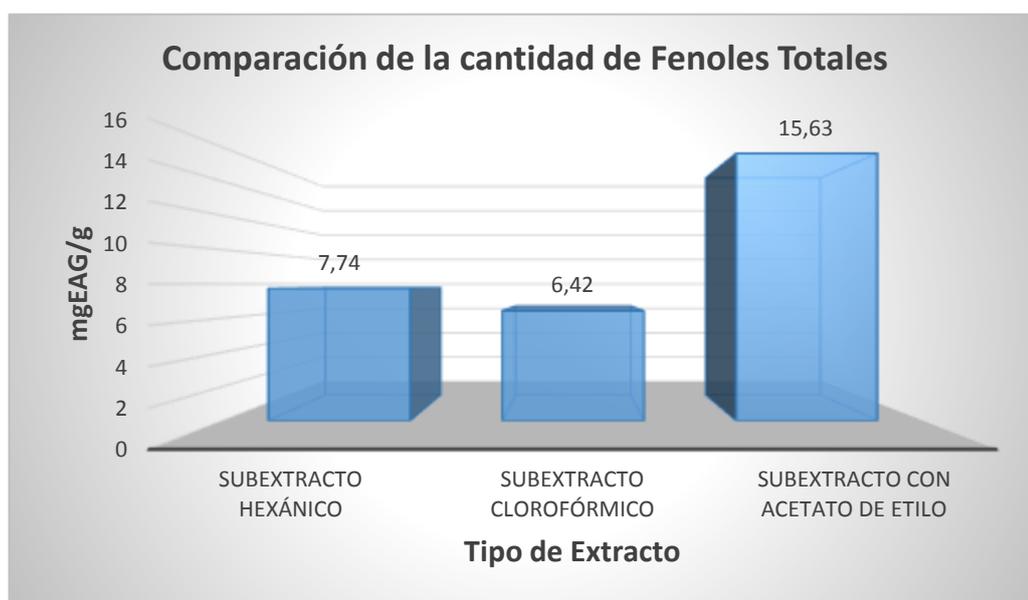


Figura 2-3: Comparativa de la cantidad de Fenoles Totales entre Subextractos

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.1.9. Determinación del contenido de Flavonoides Totales

Para determinación de este ensayo se realizó una curva de calibración de quercetina con valores que van de 1 a 10 ppm (ver Figura 3-3), de forma similar a los fenoles totales se cuantifica los flavonoides mediante la ecuación de la recta $A = 0,0896C + 0,1833$ (A= Absorbancia, C= concentración) reemplazando el valor de la absorbancia y despejando la concentración dándonos como resultado la concentración en ppm para multiplicarlo por el factor de dilución rindiendo los valores de flavonoides totales expresados como mgEQ/g de extracto; los resultados fueron $0,095 \pm 0,0013$ mgEQ/g para el subextracto hexánico, $0,905 \pm 0,0007$ mgEQ/g para el subextracto

clorofórmico y con mayor cantidad $1,719 \pm 0,0009$ mgEQ/g el subextracto con acetato de etilo (ver Tabla 12-3) (ver Figura 4-3). Aunque las cantidades son relativamente bajas en comparación con estudios similares (Asma y Mohammad, 2015, pp. 318-319) no significa que presente menor actividad biológica debido a que la presencia de esos metabolitos bioactivos cumplen funciones específicas como fotoprotección en *Halenia weddeliana* Gilg, lo que se corrobora en los posteriores ensayos de fotoprotección, aunque pudiera ser que la actividad se encuentra potenciada por otros metabolitos actuando en conjunto ya que compuestos fenólicos y los polifenólicos son de gran variedad que abarca más de 8000 compuestos con diferencia tanto estructural, química como en actividad biológica (Valenzuela et al., 2014, pp. 19,20). Los flavonoides y compuestos fenólicos son los principales metabolitos de las plantas que especialmente se encuentran en las capas externas confiriéndole la capacidad antioxidante (Mei, et al., 2015, p. 307). En base a los resultados obtenidos de flavonoides totales se considera que la *Halenia weddeliana* Gilg posee una relativa cantidad de metabolitos pero que son potentes antioxidantes demostrándose en su actividad fotoprotectora.

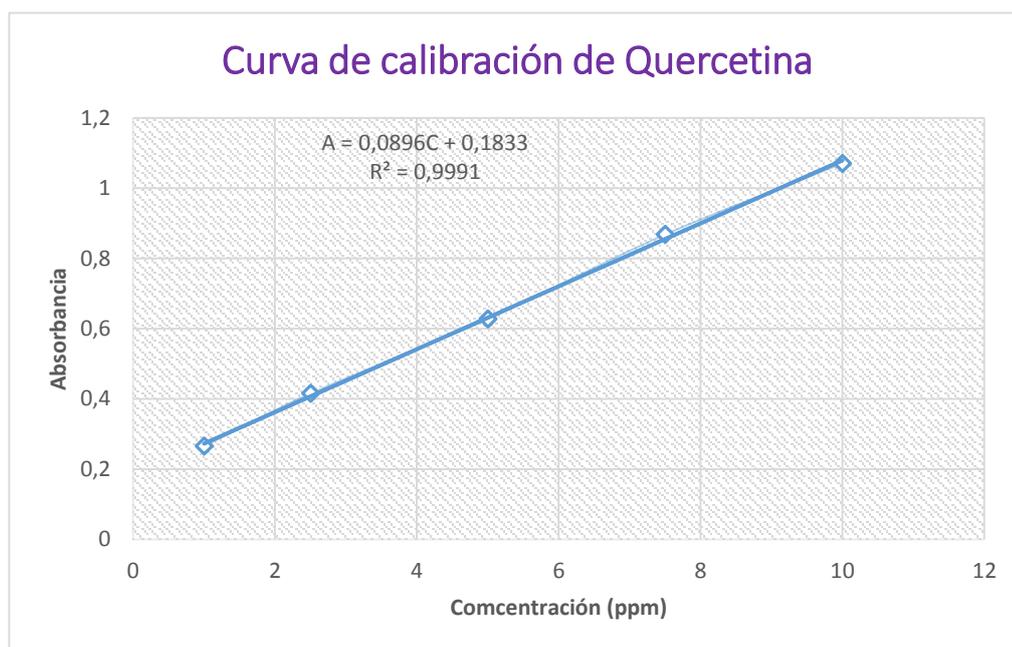


Figura 3-3: Curva de calibración del ácido gálico

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

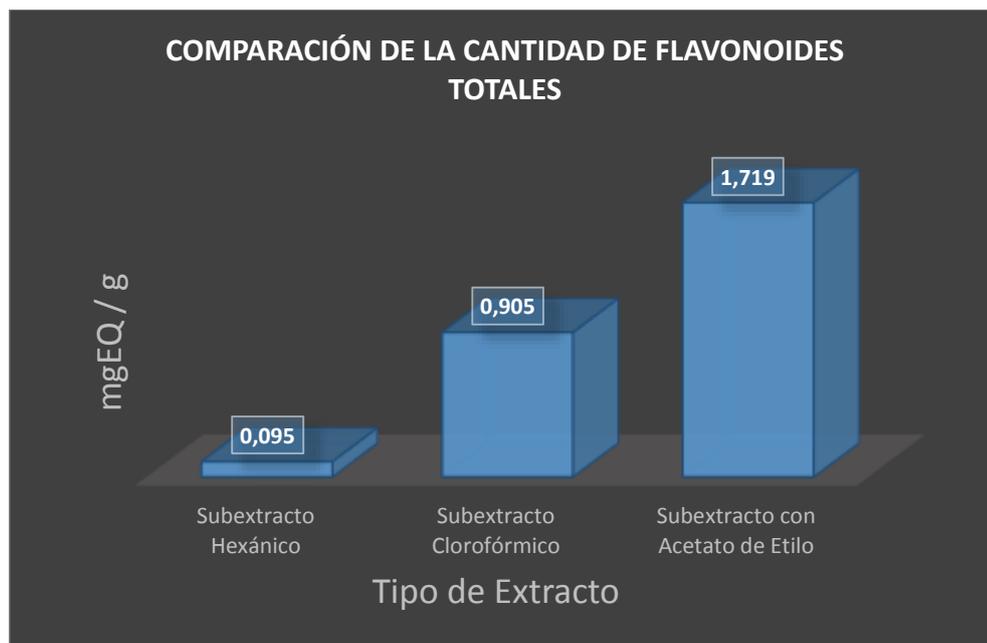


Figura 4-3: Comparativa de la cantidad de Flavonoides Totales entre Subextractos
Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.1.10. Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) *in vitro*

Los resultados obtenidos del SPF (Factor de Protección solar) mediante la ecuación de Mansur (De Oliveira, et al., 2013, p. 102) a concentraciones de 25ppm por cada subextracto son $5,414 \pm 0,0070$ para el subextracto hexánico, $13,106 \pm 0,0093$ el subextracto clorofórmico y $22,545 \pm 0,0202$ con un valor mayor el subextracto con acetato de etilo (ver Figura 5-3) (ver Tablas 12-3 a 19-3), mediante la prueba de Shapiro-Wilk verificamos que se cumple el supuesto de Normalidad con un p-value $> 0,05$ indicando que los datos se encuentran normalmente distribuidos, seguido de un test Levene para determinar la Homogeneidad de varianzas dando un p-value $< 0,05$ lo que indica la Heterogeneidad de las varianzas, y mediante el ANOVA Unifactorial con un valor p-value $< 0,05$ se observa que existen diferencias significativas de la fotoprotección contra la radiación UV-B en base a los resultados de SPF de cada subextracto, presentando mayor fotoprotección el subextracto de acetato de etilo (ver Figura 6-3) y corroborado por la prueba Post-hoc de HSD Tukey con p-value $< 0,05$ al 95% de confianza estadística (ver Anexo F). Para los análisis estadísticos se utilizó el Software IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015).

En vista de los resultados se puede estimar que la *Halenia weddeliana* Gilg presenta una excelente actividad contra la radiación UV-B, además se la puede comparar con estudios similares realizados donde con menor cantidad de Fenoles y Flavonoides Totales supera las expectativas con un gran umbral de actividad biológica partiendo a penas de 25ppm de concentración de extracto con respecto a 100ppm utilizados en el estudio *in vitro* de la actividades antioxidante y

fotoprotectores de los extractos secos de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) (De Oliveira, et al., 2013, pp. 122-127). Además, si comparamos con recientes estudios realizados por espectrofotometría ultravioleta los FPS de diferentes marcas comerciales van de 8-30 (Hojerová et al., 2011, pp. 32-36); (Abreu et al., 2004, p. 383) (ver Anexo 7, 8) correlacionando con nuestros datos los SPF de subextractos clorofórmico y con acetato de etilo se encuentran a la par como fotoprotectores incluso a baja concentración, mientras que para el hexánico habrá que aumentar la concentración. El SPF es una medida cuantitativa de la eficacia fotoprotectora garantizando que la *Halenia weddeliana* Gilg presenta metabolitos que absorben, dispersan o bloquean altamente la radiación UV-B.

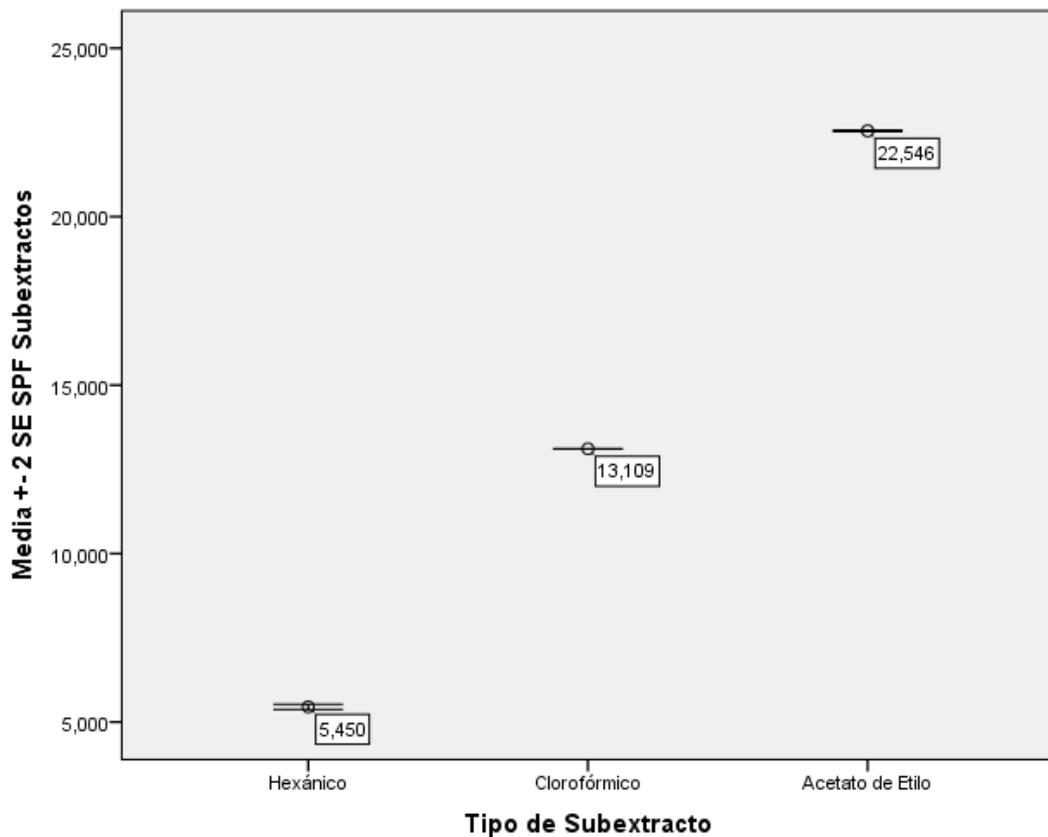


Figura 5-3: Diagrama de Caja-Bigotes Comparativo Medias (SPF) \pm DE

Fuente: IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015), 2015.

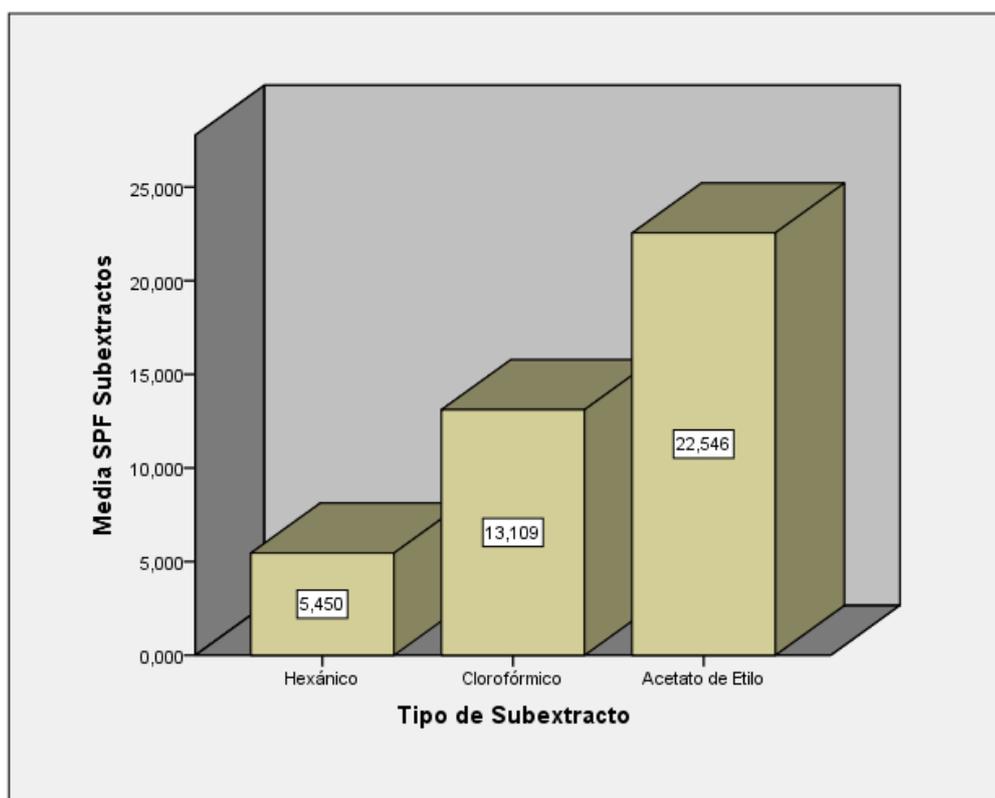


Figura 6-3: Histograma de los subextractos

Fuente: IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015), 2015.

3.1.11. Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida

El efecto protector contra los rayos UV-B de la muerte celular inducida se evaluaron usando *Escherichia coli* (ATCC 25922) como un modelo de células y se utilizó una lámpara de radiación UV-B (Philips, Broadband TL 40w/12 RS). Los resultados obtenidos son representativos debido a que todos los subextractos presentaron actividad fotoprotectora en comparación con el control negativo para cada uno y lo más importante que fueron capaces presentar mayor actividad en cuanto a los controles positivos sobre todo el subextracto de acetato de etilo, los resultados arrojados por el ensayo fueron para el subextracto hexánico la muerte celular sucedió de entre 120-150 minutos, en el subextracto clorofórmico la muerte celular disminuye por más tiempo con ocurriendo de entre 165 a 180 minutos y por último con el subextracto con acetato de etilo la muerte celular inducida logró disminuirse por muchísimo más tiempo alcanzando la cúspide de entre 225-240 minutos comprobándose de esta manera que los metabolitos presentes en la *Halenia weddeliana* Gilg son altamente fotoprotectores (ver Tablas 16-3 a 18-3). Es importante destacar que los controles positivos alcanzaron su declive fotoprotector de entre 165-180 minutos siendo mejor el OMC (octil-metoxicinamato) en cuanto tiempo de protección, mientras que el Pamidato-O su efectividad máxima de fotoprotección radica en la primera hora de exposición a la radiación UV-B. Existe una relación significativa en cuanto al tiempo máximo de protección contra UV-B

y se debe a que la concentración de Fenoles y Flavonoides Totales que varían situándose la mayor concentración de los mismos en el subextracto de acetato de etilo, cabe recalcar que el contenido de estos compuestos son relativamente pocos en la *Halenia weddeliana* Gilg pero se tiende a suponer que existen metabolitos diferentes que actúan en conjunto potenciando la actividad fotoprotectora del vegetal, propiedad que la hace mucho más apreciable como ingrediente en la elaboración de productos para protección solar (Gilaberte et al., 2003, p. 277); “a los compuestos fenólicos y flavonoides se les atribuye una importante acción en la estabilización de la oxidación lipídica tanto que han sido asociados con la capacidad atrapadora de radicales libres y se ha sugerido que tienen efecto inhibitorio sobre la mutagénesis y la carcinogénesis” (Valenzuela et al., 2014, pp. 19-20), lo cual pudo ser un factor determinante para la protección de la cepa de *Escherichia coli*.

3.2. Pruebas de hipótesis

3.2.1. Los extractos de *Halenia weddeliana* Gilg contienen compuestos fenólicos y flavonoides.

Se comprobó cualitativamente y cuantitativamente presentando alta evidencia de la presencia de estos metabolitos, lo que se puede corroborar en los (ver Tabla 2-3) (ver Anexo 9).

Tabla 2-3: Concentración de Fenoles y Flavonoides Totales

| Muestra | PT mgEAG/g ± DE | FT mgEAQ/g ± DE |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Subextracto Hexánico | 7,74 ± 019 | 0,095 ± 0,0013 |
| Subextracto Clorofórmico | 6,42 ± 0,06 | 0,905 ± 0,0007 |
| Subextracto con Acetato de Etilo | 15,63 ± 0,14 | 1,719 ± 0,0009 |

PT mgEAG/g: Fenoles Totales en mg de Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de extracto seco.

FT mgEQ/g: Flavonoides Totales en mg de Equivalentes de Quercetina por gramo de extracto seco.

Valores de las medias ± Desviación Estándar (n=3)

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.2.1. Los extractos de *Halenia weddeliana* Gilg presentan un factor de protección solar (SPF) in vitro mayor al factor mínimo de protección solar.

Mediante espectrofotometría se determinó los siguientes factores de protección solar los cuales superan por mucho el valor mínimo según COLIPA y FDA (ver Tablas 4-1, 5-1, 3-3) (ver Anexo J):

Tabla 3-3: Valores de SPF de los diferentes extractos de *Halenia weddeliana* Gilg.

| Extractos | Hexánico | Clorofórmico | Acetato de Etilo |
|-----------|--------------|---------------|------------------|
| SPF ± DE | 5,414±0,0070 | 13,106±0,0093 | 22,545±0,0202 |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.2.3. Los extractos de *Halenia weddeliana* Gilg otorgan fotoprotección a cepa de *Escherichia coli* de la radiación UV-B.

Los metabolitos de la planta protegieron de manera prolongada a la cepa de *Escherichia coli* y se puede constatar en los siguientes (ver Tablas 16-3 a 19-3) (ver Figuras 5-3 a 12-3) (ver Anexo K).

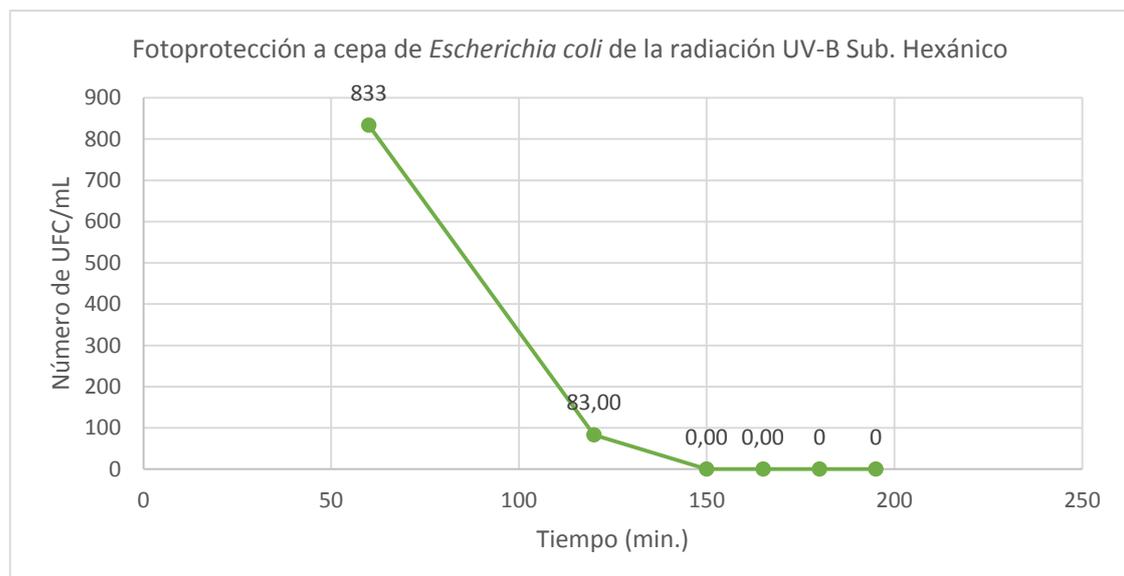


Figura 7-3: Fotoprotección celular del subextracto hexánico

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

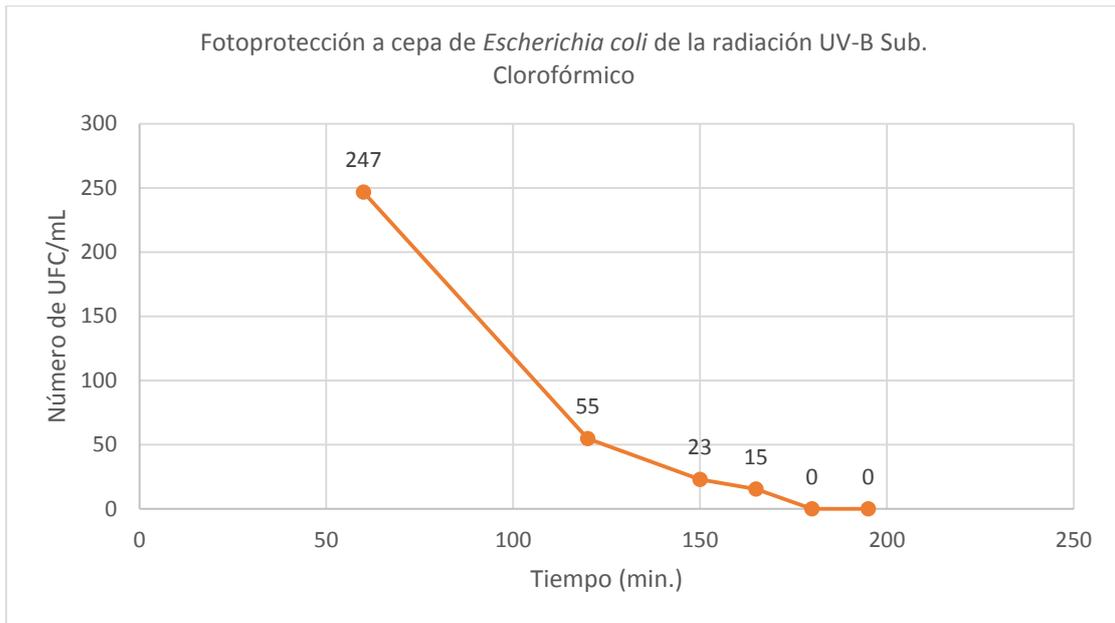


Figura 8-3: Fotoprotección celular del subextracto clorofórmico

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

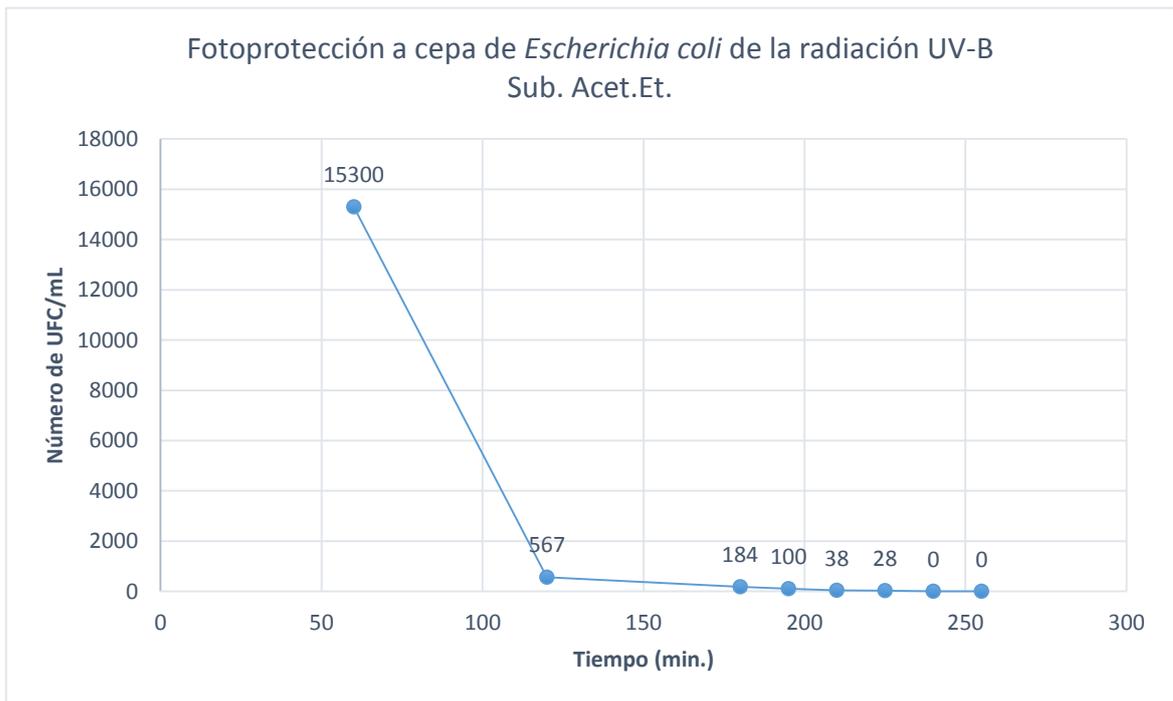


Figura 9-3: Fotoprotección celular del subextracto con acetato de etilo

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3. Presentación de resultados

3.3.1. Determinación del Contenido de Humedad

Tabla 4-3: Resultados de la Humedad \pm DE

| % de Humedad | Límite de Humedad Normativa Ecuatoriana de Fitoterápicos |
|------------------|----------------------------------------------------------|
| 13,21 \pm 0,04 | 14% |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.2. Determinación de Cenizas Totales

Tabla 5-3: Resultados de Cenizas Totales \pm DE

| Base hidratada | Base anhidra | Límite Farmacopea Española |
|-----------------|-----------------|----------------------------|
| 1,63 \pm 0,17 | 1,88 \pm 0,19 | 5% |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.3. Determinación de Cenizas Solubles en Agua

Tabla 6-3: Resultados de Cenizas Solubles en Agua \pm DE

| Base hidratada | Base anhidra | Límite Farmacopea Española |
|-----------------|----------------|----------------------------|
| 0,94 \pm 0,17 | 1,08 \pm 0,2 | 2% |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.4. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

Tabla 7-3: Resultados de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico en Agua \pm DE

| Base hidratada | Base anhidra | Límite Farmacopea Española |
|-----------------|-----------------|----------------------------|
| 0,12 \pm 0,02 | 0,18 \pm 0,02 | 1% |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.5. Tamizaje Fitoquímico

Tabla 8-3: Resultados del Tamizaje Fitoquímico

| Metabolitos | Ensayo | Extracto Etéreo | Extracto Hidro-alcohólico | Extracto Acuoso |
|--------------------------|--------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| Alcaloides | Dragendorff | - | - | - |
| | Mayer | - | - | - |
| | Wagner | - | - | - |
| Lactonas y Cumarinas | Baljet | ++ | ++ | |
| Triterpenos y Esteroides | Lieberman-Burchard | +++ | +++ | |
| Aceites y Grasas | Sudan III | +++ | | |
| Resinas | Resinas | | - | |
| Azúcares reductores | Fehling | | +++ | +++ |
| Saponinas | Espuma | | +++ | +++ |
| Fenoles y Taninos | FeCl ₃ | | +++ | +++ |
| Quinonas | Borntrager | | +++ | |
| Flavonoides | Shinoda | | +++ | +++ |
| Mucílagos | Mucílagos | | | - |
| Catequinas | Catequinas | | +++ | |
| Interpretación: | | | | |

| |
|-----------------------------------------------|
| Negativo (-) |
| Posible presencia del metabolito (+) |
| Moderada presencia del metabolito (++) |
| Alta presencia del metabolito (+++) |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.6. Rendimiento y Cantidad de los Subextractos de *Halenia weddeliana* Gilg

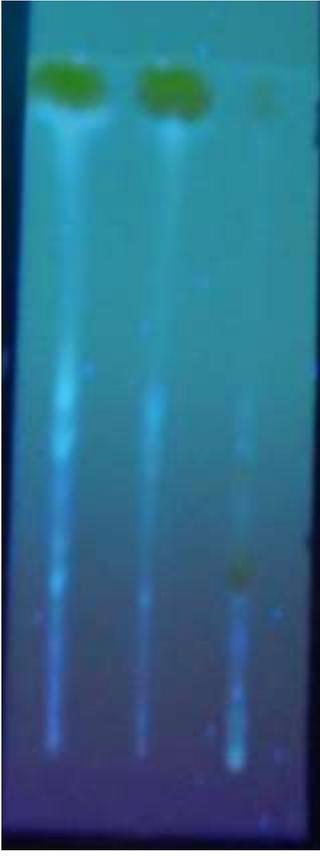
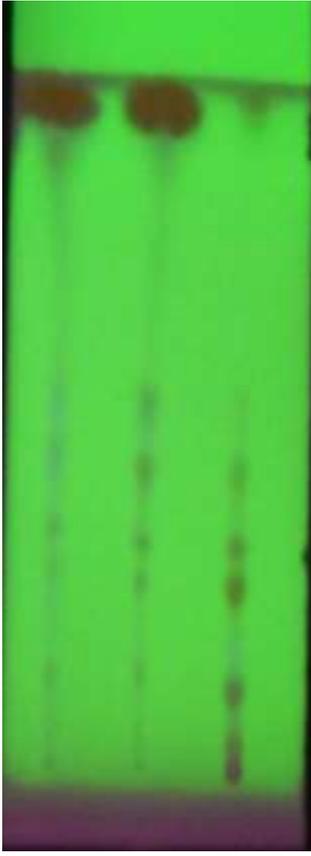
Tabla 9-3: Resultados del rendimiento de los subextractos objeto de estudio

| | SubH | SubC | SubAE |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| P₁ | 118,797 | 98,674 | 106,440 |
| P₂ | 118,998 | 99,028 | 106,650 |
| CS | 0,201 | 0,354 | 0,210 |
| P | 54,179 | | |
| R | 0,37 | 0,65 | 0,39 |
| Interpretación: | | | |
| <p>P₁: Peso del Balón Tarado (g); P₂: Peso Balón + Subextracto (g) (A partir de 50 mL de ExEtOH)</p> <p>CS: Cantidad del Subextracto (g) (P₂ - P₁)</p> <p>P: Peso del vegetal <i>Halenia weddeliana</i> Gilg (g)</p> <p>R: % de Rendimiento</p> <p>SubH: Subextracto Hexánico</p> <p>SubC: Subextracto Clorofórmico</p> <p>SubAE: Subextracto con Acetato de etilo</p> <p>ExEtOH: Extracto Etanólico al 96%.</p> | | | |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.7. Análisis Cualitativo de los Grupos Fitoquímicos por TLC (Cromatografía en Capa Fina).

Tabla 10-3: Resultados del perfil cromatográfico visto por UV

| Subextracto Hexánico | Subextractos (clorofórmico, acetato de etilo) y etanólico 96% | Subextractos (clorofórmico, acetato de etilo) y etanólico 96% |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |
| UV-365 nm | UV-365 nm | UV-254 nm |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.8. Determinación del contenido de Fenoles Totales

Tabla 11-3: Resultados de la concentración de Fenoles Totales

| Muestra | PT mgEAG/g ± DE |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Subextracto Hexánico | 7,74 ± 0,19 |
| Subextracto Clorofórmico | 6,42 ± 0,06 |
| Subextracto con Acetato de Etilo | 15,63 ± 0,14 |
| PT mgEAG/g: Fenoles Totales en mg de Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de extracto seco. | |
| Valores de las medias ± Desviación Estándar (n=3) | |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.9. Determinación del contenido de Flavonoides Totales

Tabla 12-3: Resultados de la concentración de Flavonoides Totales

| Muestra | FT mgEQ/g ± DE |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Subextracto Hexánico | 0,095 ± 0,0013 |
| Subextracto Clorofórmico | 0,905 ± 0,0007 |
| Subextracto con Acetato de Etilo | 1,719 ± 0,0009 |
| FT mgEQ/g: Flavonoides Totales en mg de Equivalentes de Quercetina por gramo de extracto seco. | |
| Valores de las medias ± Desviación Estándar (n=3) | |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.10. Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) *in vitro*

Tabla 13-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto hexánico

| Factor de Protección Solar (SPF) <i>in vitro</i> del Subextracto Hexánico (25ppm) | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|-------------|---------------------|
| N° | (λ) nm | Abs.1 | Abs.2 | Abs.3 | X ± DE | EExI | FPS ± DE |
| 1 | 290 | 0,460 | 0,460 | 0,461 | 0,460±0,0005 | 0,0150 | 0,069±0,0001 |
| 2 | 295 | 0,488 | 0,488 | 0,489 | 0,488±0,0005 | 0,0817 | 0,399±0,0004 |
| 3 | 300 | 0,531 | 0,531 | 0,532 | 0,531±0,0005 | 0,2874 | 1,526±0,0014 |
| 4 | 305 | 0,555 | 0,559 | 0,560 | 0,558±0,0022 | 0,3278 | 1,829±0,0041 |
| 5 | 310 | 0,564 | 0,564 | 0,565 | 0,564±0,0005 | 0,1864 | 1,051±0,0009 |
| 6 | 315 | 0,539 | 0,539 | 0,539 | 0,539±0,0000 | 0,0839 | 0,452±0,0000 |
| 7 | 320 | 0,490 | 0,491 | 0,491 | 0,491±0,0005 | 0,0180 | 0,088±0,0001 |
| FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (SPF) | | | | | | | 5,414±0,0070 |
| <p>(λ) nm: Longitud de onda</p> <p>Abs.: Absorbancia</p> <p>X ± DE: Media ± Desviación Estándar</p> <p>EExI: La función del producto normalizado utilizado en el cálculo del SPF</p> <p>SPF: Factor de Protección Solar</p> | | | | | | | |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

Tabla 14-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto clorofórmico

| Factor de Protección Solar (SPF) <i>in vitro</i> del Subextracto Clorofórmico (25ppm) | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|-------|-------|--------------|--------|----------------------|
| N° | (λ) nm | Abs.1 | Abs.2 | Abs.3 | X ± DE | EExI | FPS ± DE |
| 1 | 290 | 1,078 | 1,079 | 1,080 | 1,079±0,0008 | 0,0150 | 0,162±0,0001 |
| 2 | 295 | 1,213 | 1,211 | 1,210 | 1,211±0,0012 | 0,0817 | 0,989±0,0010 |
| 3 | 300 | 1,320 | 1,317 | 1,318 | 1,318±0,0012 | 0,2874 | 3,788±0,0034 |
| 4 | 305 | 1,355 | 1,356 | 1,358 | 1,356±0,0012 | 0,3278 | 4,445±0,0039 |
| 5 | 310 | 1,332 | 1,332 | 1,332 | 1,332±0,0000 | 0,1864 | 2,483±0,0000 |
| 6 | 315 | 1,240 | 1,241 | 1,239 | 1,240±0,0008 | 0,0839 | 1,040±0,0007 |
| 7 | 320 | 1,110 | 1,110 | 1,108 | 1,109±0,0009 | 0,0180 | 0,199±0,0002 |
| FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (SPF) | | | | | | | 13,106±0,0093 |
| <p>(λ) nm: Longitud de onda</p> <p>Abs.: Absorbancia</p> <p>X ± DE: Media ± Desviación Estándar</p> <p>EExI: La función del producto normalizado utilizado en el cálculo del SPF</p> <p>SPF: Factor de Protección Solar</p> | | | | | | | |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

Tabla 15-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto con acetato de etilo

| Factor de Protección Solar (SPF) <i>in vitro</i> del Subextracto con Acetato de Etilo (25ppm) | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|-------|-------|--------------|--------|--------------|
| N° | (λ) nm | Abs.1 | Abs.2 | Abs.3 | □ ± DE | EExI | FPS ± DE |
| 1 | 290 | 1,914 | 1,915 | 1,915 | 1,915±0,0005 | 0,0150 | 0,287±0,0001 |
| 2 | 295 | 2,084 | 2,082 | 2,083 | 2,083±0,0008 | 0,0817 | 1,702±0,0007 |
| 3 | 300 | 2,220 | 2,223 | 2,227 | 2,223±0,0029 | 0,2874 | 6,389±0,0083 |
| 4 | 305 | 2,322 | 2,321 | 2,324 | 2,322±0,0012 | 0,3278 | 7,612±0,0039 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|-------|-------|--------------|--------|----------------------|
| 5 | 310 | 2,319 | 2,319 | 2,316 | 2,318±0,0014 | 0,1864 | 4,321±0,0026 |
| 6 | 315 | 2,216 | 2,220 | 2,227 | 2,221±0,0045 | 0,0839 | 1,863±0,0038 |
| 7 | 320 | 2,053 | 2,062 | 2,063 | 2,059±0,0045 | 0,0180 | 0,371±0,0008 |
| FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (SPF) | | | | | | | 22,545±0,0202 |
| <p>(λ) nm: Longitud de onda</p> <p>Abs.: Absorbancia</p> <p>X ± DE: Media ± Desviación Estándar</p> <p>EExI: La función del producto normalizado utilizado en el cálculo del SPF</p> <p>SPF: Factor de Protección Solar</p> | | | | | | | |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

3.3.11. Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida

Tabla 16-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto hexánico

| <i>Tiempo (min.)</i> | <i>Número de UFC/mL OMC Sub. H. ± DE</i> | <i>Número de UFC/mL OMC (ESTÁNDAR 1)</i> | <i>Número de UFC/mL Pamidate-O (ESTÁNDAR 2)</i> |
|--------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 60 | 833 ± 17,0 | 231 | 234 |
| 120 | 83 ± 3,6 | 108 | 80 |
| 150 | 0 | 75 | 16 |
| 165 | 0 | 50 | 9 |
| 180 | 0 | 0 | 0 |
| 195 | 0 | 0 | 0 |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

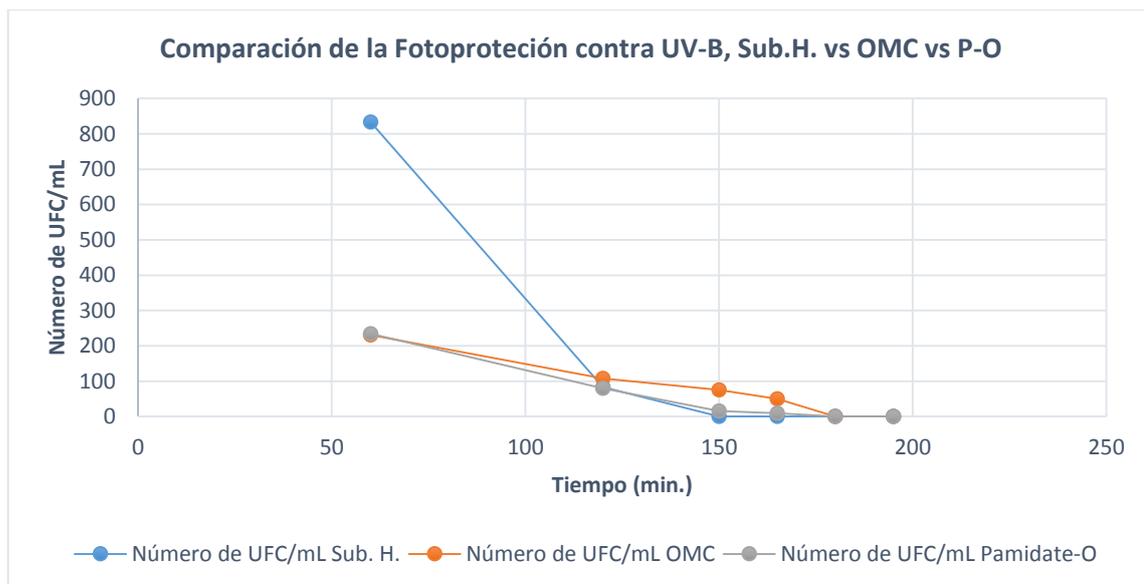


Figura 10-3: Comparativa del subextracto hexánico vs (ESTÁNDAR 1 y 2)

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

Tabla 17-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto clorofórmico

| Tiempo (min.) | Número de UFC/mL Sub. CL. ± DE | Número de UFC/mL OMC (ESTÁNDAR 1) | Número de UFC/mL Pamidate-O (ESTÁNDAR 2) |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|
| 60 | 247 ± 12,5 | 231 | 234 |
| 120 | 55 ± 8,1 | 108 | 80 |
| 150 | 23 ± 2,4 | 75 | 16 |
| 165 | 15 ± 1,2 | 50 | 9 |
| 180 | 0 | 0 | 0 |
| 195 | 0 | 0 | 0 |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

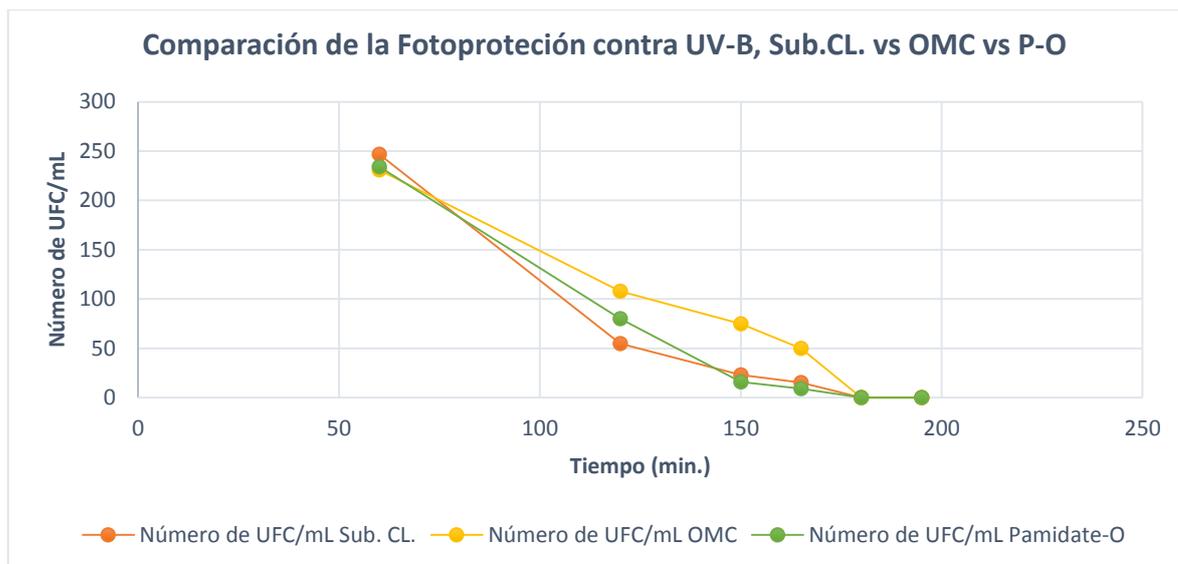


Figura 11-3: Comparativa del subextracto clorofórmico vs (ESTÁNDAR 1 y 2)

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

Tabla 18-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto con acetato de etilo

| Tiempo (min.) | Número de UFC/mL Sub. Acet.Et. ± DE | Número de UFC/mL OMC | Número de UFC/mL Pamidate-O |
|---------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 60 | 1,53E+04 ± 2054,8 | 231 | 234 |
| 120 | 567 ± 20,5 | 108 | 80 |
| 180 | 184 ± 20,8 | 0 | 0 |
| 195 | 100 ± 4,5 | 0 | 0 |
| 210 | 38 ± 2,4 | 0 | 0 |
| 225 | 28 ± 2,9 | 0 | 0 |
| 240 | 0 | 0 | 0 |
| 255 | 0 | 0 | 0 |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

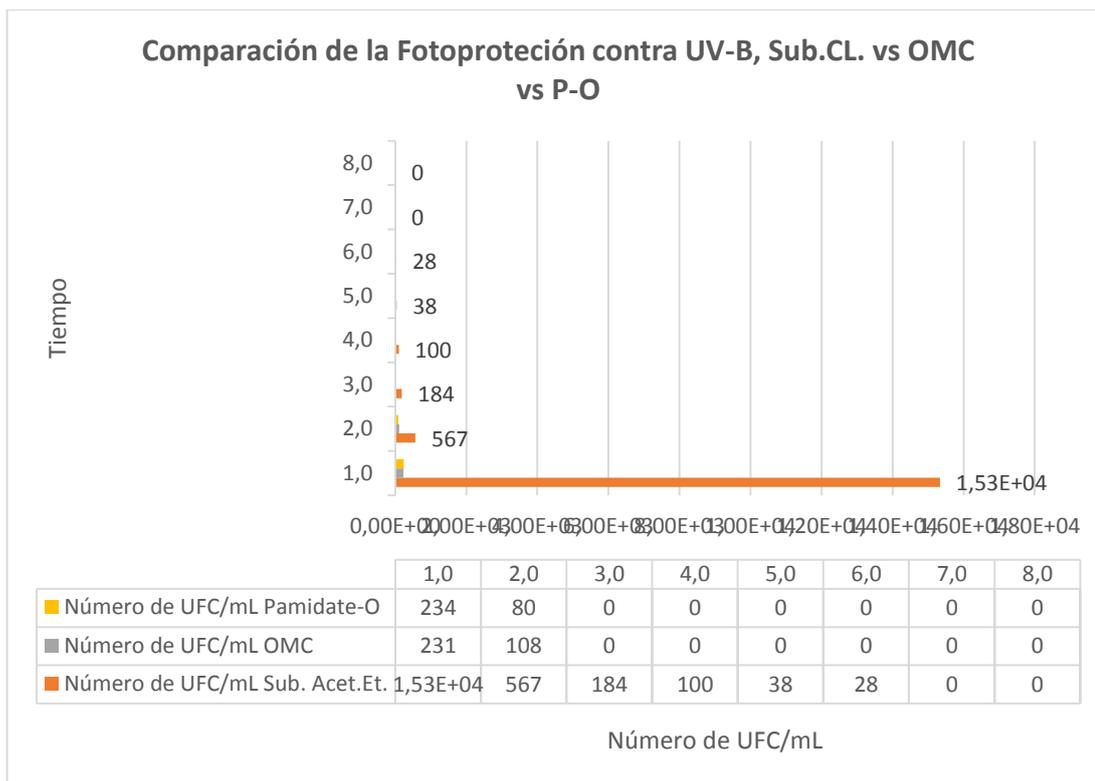


Figura 12-3: Comparativa del subextracto con acetato de etilo vs (ESTÁNDAR 1 y 2)

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

Tabla 19-3: Controles negativos (Hexano, Cloroformo, Acetato de Etilo)

| Tiempo (min.) | Número de UFC/mL | Número de UFC/mL | Número de UFC/mL |
|---------------|------------------|------------------|------------------|
| | (H-) ± DE | (CL-) ± DE | (Ac. Et.-) ± DE |
| 30 | 132 ± 6,2 | 136 ± 7,3 | 1533 ± 47,1 |
| 60 | 0 | 0 | 383 ± 17,0 |
| 90 | 0 | 0 | 0 |
| 120 | 0 | 0 | 0 |

Realizado por: Johnny Sinmaleza, 2015.

CONCLUSIONES

- Los extractos de la *Halenia weddeliana* Gilg presentaron actividad fotoprotectora al irradiarse con UV-B, el subextracto de acetato de etilo concede mayor fotoprotección en relación a los demás subextractos.
- Se determinó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas, taninos, catequinas, quinonas, triterpenos, mediante tamizaje fitoquímico; cuantificación de fenoles totales con $29,79 \pm 0,39$ mgEAG/g de extracto y $2,72 \pm 0,0029$ mgEQ/g de extracto partiendo de 100g de la droga cruda, los que se presume son responsables de la fotoprotección.
- Los compuestos fenólicos y flavonoides en colaboración con otros posibles metabolitos pudieron incidir en el factor de protección solar (SPF) *in vitro* obteniéndose un $SPF_{\text{Subextracto H.}} = 5,414 \pm 0,0070$; $SPF_{\text{Subextracto CL.}} = 13,106 \pm 0,0093$ y $SPF_{\text{Subextracto Acet. Et.}} = 22,545 \pm 0,0202$, evidenciando la capacidad fotoprotectora a 25ppm. De acuerdo a los resultados obtenidos una mayor concentración de los subextractos de *Halenia weddeliana* Gilg otorgará mayor SPF.
- Los subextractos de *Halenia weddeliana* Gilg a 2mg/mL presentaron actividad fotoprotectora en la muerte celular inducida a *Escherichia coli*, otorgándoles mayor tiempo de vida al ser irradiados con UV-B, con tiempo máximo de deceso 225-240 minutos para el subextracto de acetato de etilo siendo el más representativo, sin dejar de lado al clorofórmico y hexánico manteniéndose al nivel del estándar octil-metoxicinamato y Pamidato-O.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con la investigación de *Halenia weddeliana* Gilg a fin de determinar exactamente los metabolitos responsables de la actividad fotoprotectora e incluirlos en una formulación farmacéutica.
- En caso de realizar el ensayo de fotoprotección por muerte inducida con *Escherichia coli* se recomienda usar un asa calibrada para cultivar las bacterias en el agar.
- Se recomienda tramitar el permiso del Ministerio del Ambiente para recolección de la droga cruda a fin de que no ocurra inconvenientes al publicar la tesis o continuar con el estudio de la misma en el exterior.
- Promover con la investigación científica sobre las planta nativas del país pues muchas de ellas contienen grandes propiedades medicinales que necesitan determinarse, fomentándose de esta manera el conocimiento ancestral y contribuyendo a la investigación científica que a nuestro país le hace tanta falta.
- Difundir los conocimientos adquiridos, especialmente fomentar la importancia que tiene el uso de los protectores solares para nuestra salud pues los casos de cáncer de piel va en auge.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABREU DUTRA, E.; et al.** “*Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry*”. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* [en línea], 2004, (Brasil) 40(3), p. 383. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n3/14.pdf>
2. **AGENCIA ESPACIAL CIVIL ECUATORIANA.** *Informe Hiperión* [En línea], 2008. [Consulta: 07 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.exa.ec/bp21/index-es.html>
3. **AGUILAR, Z.; Ulloa, C. & HIDALGO, P.** *Guía de Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador* [en línea]. Ecuador: Patricio Mena Vásconez, 2009. [Consulta: 07 Enero 2015]. Disponible en: http://www.ecociencia.org/archivos/guia_plantas-091128.pdf
4. **AMERICA SOCIETY CANCER.** *Cáncer de piel: células basales y células escamosas* [en línea]. USA: 2014. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002321-pdf.pdf>
5. **FIGUEIREDO, Sônia et al.** *In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of Garcinia brasiliensis epicarp extract.* *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2014, (Brasil) 131, p. 65. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414000050?np=y>
6. **ARAGADVAY, S.** *Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (Baccharis latifolia) y hierbamora (Solanum nigrum).* Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2009, pp 65-69. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/216/1/56T00190.pdf>
7. **ASMA, A. & MOHAMMAD, H.** *Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases.* *Asian Pacific Journal of Tropical*

Disease [en línea], 2015, (Sultanate of Oman) 5(4), pp. 318-319. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180814607908>

8. **AVILA ACEVEDO, J. G. et al.** *Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. Fitoterapia* [en línea], 2005, (México) 76, pp. 301-309. [Consulta: 18 Enero 2015].
Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X05000535>
9. **BREWER, M.** *Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [en línea], 2011, (USA) 10, pp. 221-227. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x/abstract>
10. **CAZORLA MARTÍNEZ, M. P.** *Actividad fotoprotectora de la maracuyá (*Passiflora edulis*), Ishpingo (*Ocotea quixos*) en fototipos III (*Homo sapiens*) para elaboración de un protector solar*. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2013, pp 17-34. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3498/1/236T0102%20UDCTFC.pdf>
11. **CRUZ ATI, P.** *Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), matico (*Aristiguetia glutinosa*) y marco (*Ambrosia arborescens*) para NEO-FÁRMACO*. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2009, pp 65-84. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/218/1/56T00192.pdf>
12. **DE ARGILA, D. et al.** *Estudio de las fotodermatitis idiopáticas y exógenas. Parte I: fisiopatología y aspectos técnicos del estudio fotobiológico. ACTAS Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2012, (España) 105(3), pp. 1-3. 2012. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: www.elsevier.es/es-revista---pdf-90277664-S300
13. **DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, k. K. & HAI LIU, R.** *Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea], 2002, (USA) 50, pp. 3010-3014. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://ucanr.edu/datastoreFiles/608-418.pdf>

14. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE.** *Halenia weddeliana* Gilg [en línea], USA: 2013. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://eol.org/pages/6853614/details>
15. **ENRÍQUEZ, A. M. et al.** *Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de Zingiber officinale Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Revista Médica Vallejana* [en línea], 2008, (Perú) 5(1), p. 57. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/rmv/v5n1/a07v5n1.pdf>
16. **ESTEVA, E.** *Fotoprotección. Consejos, precauciones y productos solares. OFFARM* [en línea], 2005, (España) 24(5), p. 70. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?f=10&pident_articulo=13074469&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=151&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v24n05a13074469pdf001.pdf
17. **FALEIRO NAVES, P. L.** *Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas.* Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II. Madrid, España. 2010, pp. 25-35. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>
18. **FLORES ALONSO, O.** *Educación médica continua. El Sol y la piel. Fotodermatosis. Revista del Centro Dermatológico Pascua* [en línea], 2000, (México) 9(2), pp. 126-131. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derma/cd-2000/cd0021.pdf>
19. **FREE AND OPEN ACCESS TO BIODIVERSITY DATA.** *Halenia weddeliana* Gilg [En línea]. USA: 2013. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.gbif.org/species/131727904>
20. **GAROLI, D. et al.** *Sunscreen tests: Correspondence between in vitro data and values reported by the manufacturers. Journal of Dermatological Science* [en línea], 2008, (Italia) 52, pp. 193-204. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181108002028>

21. **GILABERTE, Y.; COSCOJUELA, C.; SÁENZ, C. & GONZÁLEZ, S.** *Fotoprotección. Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2003, (USA) 94(5), p. 277. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.actasdermo.org/es/fotoproteccion/articulo/13048173/>
22. **GOLDSMITH, Lowell et al.** *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 8^{va} ed. New York-USA, 2012, The McGraw-Hill Companies, Inc., pp. 1031-1039.
23. **GONÇALVES DE OLIVEIRA, R. J. et al.** *In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from Neoglaziovia variegata (Bromeliaceae)*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [en línea], 2013, (Brasil) 3(1), pp. 122-127. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812888/>
24. **GONÇALVES DE OLIVEIRA, R. J. et al.** *Dried extracts of Encholirium spectabile (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro*. *Journal of Young Pharmacists* [en línea], 2013, (Brasil) 5, p. 102. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S097514831300040X>
25. **GUADARRAMA GONZÁLEZ, P.** *Fundamentos filosóficos y epistemológicos de la investigación. Centro de Estudios Miguel Enriquez* [en línea], 2008, (Brasil) pp. 1-2. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en:
http://www.archivochile.com/Ideas_Autores/guadarramapg/guadarramapg00012.pdf
26. **GUALLI ADAS, A. E.; ARIAS ARIAS, R. V. & MANZANO SANTANA, P.** *Estudio Comparativo del Té de la especie (Ilex guayusa) procedente de la Región Amazónica y el producto comercial de la empresa "Aromas del Tungurahua"*. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Mecánica y Ciencia de la Producción. Guayaquil, Ecuador. 2012, pp. 1-5. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24391/1/Paper%20tesis%20adraian.a.%20segunda%20revisi%C3%B3n%20Dra%20Manzano.pdf>
27. **GUERRERO, David.** *Actividad hipoglucemiante del extracto de las hojas de Oreocallis grandiflora en ratas (Rattus norvegicus) por inhibición de alfa-amilasa*. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2014, pp 22-28, 31-39. [Consulta: 21 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3428/1/56T00447.pdf>

28. **GUTIÉRREZ VIDRIO, R. M.** *Cáncer de piel. Revista de la Facultad de Medicina UNAM* [en línea], 2003, (México) 46(4), p. 166-171. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2003/un0341.pdf>
29. **HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A. & MIKULA, M.** *Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. International Journal of Pharmaceutics* [en línea], 2011, (Eslovaquia) 408(1-2), pp. 32-36. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311000718>
30. **HUANG, B. et al.** *Extracts of Halenia elliptica exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. Food and Chemical Toxicology* [en línea], 2011, (China) 49(1), pp. 185-190. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510006277>
31. **HUPEL, M.; POUPART, N. & AR GALL, E.** *Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. Talanta* [en línea], 2011, (Francia) 86, pp. 362-364. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011008344>
32. **KROL, W. et al.** *Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 1996, (Israel) 55(1), pp. 19-25. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874196014663>
33. **MEI, Y. et al.** *Phytochemical profiles, antioxidant activities of functional herb Abrus cantoniensis and Abrus mollis. Food Chemistry* [en línea], 2015, (China) 177, p. 307. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615000564>
34. **MÉNDEZ FLORES, Avilio.** *Escherichia coli* [blog]. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>
35. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA.** *Tasa de mortalidad en el Ecuador producto del cáncer* [En línea]. Ecuador: MSP, 2013. [Consulta: 07 Enero 2015]. Disponible en: <http://instituciones.msp.gob.ec/somossalud/index.php/enterate/200-el-30-a-40-de-casos-de-cancer-podrian-evitarse-si-se-cambian-cinco-malos-habitos>

36. **MIRANDA MARTÍNEZ, M. & CUÉLLAR CUÉLLAR, A.** *Farmacognosia y productos naturales*. ed. Habana-Cuba, 2001, Félix Varela, pp. 141, 207, 291-292.
37. **OCHOA PACHECO, A. et al.** *Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea], 2013, (México) 44(1), p. 57. [Consulta: 25 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/579/57929946007.pdf>
38. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** *Cánceres de origen ambiental y ocupacional* [en línea]. USA: Nota descriptiva N°350, 2011. [Consulta: 25 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs350/es/>
39. **ORDOÑEZ, A.; GOMEZ, J.; VATTUONE, M. & LSLA, M.** *Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts*. *Food Chemistry* [en línea], 2006, (Argentina) 97(3), p. 454. [Consulta: 25 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605003997>
40. **PARDO ZAPATA, J.** *Patentabilidad de los extractos vegetales* [En línea]. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en:
http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractosplantas.pdf
41. **PINEDO V., J. et al.** *Spectral signature of ultraviolet solar irradiance in Zacatecas*. *Geofísica Internacional* [en línea], 2006, (México) 45(4), pp. 263-264. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/geoint/v45n4/v45n4a5.pdf>
42. **RODRIGUEZ, S. et al.** Xanthonés, Secoiridoides And Flavonoids From *Halenia corniculata*. *Phytochemistry* [en línea], 1995, (Mongolia) 40(4), pp. 1265-1272. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229500402S>
43. **SAYRE, R. M.; POH AGIN, P.; LE VEE, G. J. & MARLOWE, E.** *A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas*. *Photochemistry and Photobiology* [en línea], 1979, (USA) 29(3), pp. 559-566. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x/abstract>

44. **SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO (SENPLADES).** *Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017*. Quito-Ecuador: Fander Falconí, 2013, pp. 135-152.
45. **SHARAPIN, N.** *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. ed. Texas-USA, 2000, Convenio Andrés Bello, pp. 146-150
46. **SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R. & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.** *Polyphenols and flavonoids. Methods in Enzymology*, 1999, (USA) 299, pp. 152-178. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>
47. **SOCIEDAD ARGENTINA DE DERMATOLOGÍA.** *Manual De Cuidado Y Prevención* [en línea], 2012, (Argentina) pp. 2-7. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.cancerdepiel.org.ar/manual/manual.pdf>
48. **SOCIETY AMERICAN CANCER.** 2014. *Ultraviolet (UV) Radiation* [en línea]. [Consulta: 21 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/radiationexposureandcancer/uvradiation/uv-radiation-toc>
49. **SOLCA, Guayaquil.** *Registro de Tumores* [en línea]. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/reportes/Grafico1-1.jsp>
50. **SOLCA, Quito.** *Cáncer de piel* [en línea]. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.solcaquito.org.ec/index.php/en/el-cancer/tipos-de-cancer/cancer-de-piel>
51. **SUN, Y.; LIU, G.; HUANG, H. & YU, P.** *Chromone derivatives from Halenia elliptica and their anti-HBV activities. Phytochemistry* [en línea], 2012, (China) 75, pp. 169-176. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942211004730>
52. **THE EUROPEAN COSMETIC ASSOCIATION (COLIPA).** *Method for in vitro determination of UVA protection. Guideline* [en línea], 2009, (USA) pp. 2-13. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2494.2009.00542.x/abstract>

- 53. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.** *Cromatografía En Placa Fina*, Madrid-España: s.n [en línea]. 2008, pp. 1-4. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>
- 54. UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL SUR DEL LAGO "JESÚS MARÍA" SEMPRUM.** *Manual de Plantas Medicinales* [En línea], 2011, (México), pp. 1-10. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/4063156/Manual-de-plantas-medicinales#scribd>
- 55. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID.** *Obtención De Extractos Y Esencias - OCW UPM* [en línea], 2004, pp. 1-13. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
- 56. VALENZUELA, G. M. et al.** *Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de Cucurbita spp. Dominguezia* [en línea], 2014, (Argentina) 30(1), pp. 19,20. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/3012.pdf>
- 57. VILLAR DEL FRESNO, A. M.** *Farmacognosia General*. ed. España, 1999, Síntesis, S. A., pp. 136-267.
- 58. VIOLANTE P., I. M. et al.** *Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2009 (Brasil) 19(2A), pp. 252-253. [Consulta: 27 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n2a/a20v192a.pdf>
- 59. WAGNER, H. & BLADT, S.** *Plant Drug Analysis*. 2^{da} ed. Munich, 1996, Springer, pp. 146, 147, 190, 191.
- 60. WOLFF, K. & ALLEN JOHNSON, R.** *Fitzpatrick's Color Atlas And Synopsis Of Clinical Dermatology*. 6^{ta} ed. New York, 2009, The McGraw-Hill Companies, pp. 232-244.
- 61. WU, S.-J. & LEAN-TEIK, N.** *Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (Momordica charantia Linn. var. abbreviata Ser.) in Taiwan. LWT* [en línea], 2008, (Taiwan) 41(2), p. 323–330. [Consulta: 29 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643807001181>

62. ZUBELDIA, J. M.; BAEZA, M. L.; JÁUREGUI, I. & SENENT, C. J. *Libro De Las Enfermedades Alérgicas De La Fundación BBVA*. ed. Bilbao, 2012, Editorial Nerea, S. A., pp. 207-213.

ANEXOS

Anexo A. Control de Calidad del vegetal

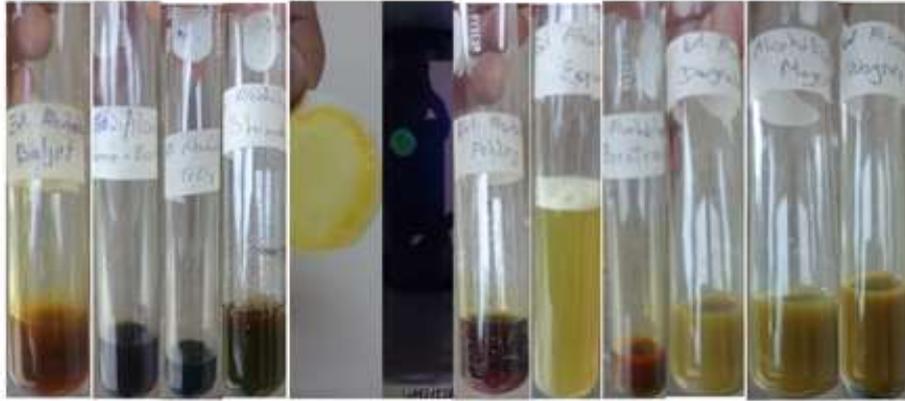
| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |
| Determinación de cenizas totales | Cenizas solubles en agua | Cenizas insolubles en ácido clorhídrico |

Anexo B. Tamizaje Fitoquímico

Tamizaje fitoquímico extracto etéreo



Tamizaje fitoquímico extracto hidro-alcohólico



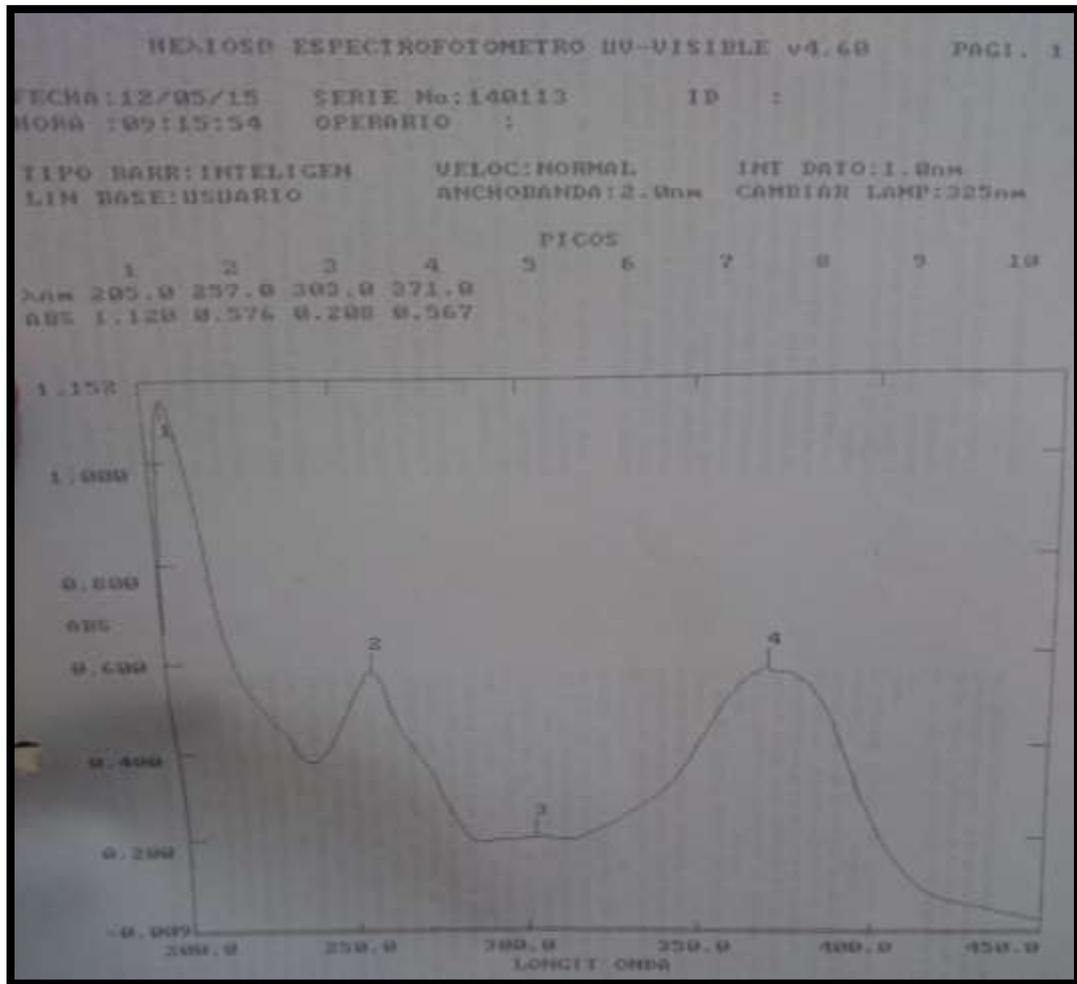
Tamizaje fitoquímico extracto acuoso



Anexo C. Absorbancias para curva de calibración del ácido gálico

| HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 | | PAGI. 1 | |
|--------------------------------------------|---------------------|----------------|-----|
| FECHA:07/05/15 | SERIE No:140113 | ID : | |
| HORA :14:41:46 | OPERARIO : | | |
| SELEC. λ:SENCILLA | ANCHOBANDA:2.0nm | INTEGRACION:1s | |
| CAMBIAR LAMP:325nm | TIEMP RETRASO:00:00 | | |
| LONG. ONDA:765.0nm | | | |
| MUESTRA | ABS | MUESTRA | ABS |
| 16 | 0.067 | | |
| 17 | 0.067 | | |
| 18 | 0.067 | | |
| 19 | 0.101 | | |
| 20 | 0.101 | | |
| 21 | 0.101 | | |
| 22 | 0.135 | | |
| 23 | 0.135 | | |
| 24 | 0.135 | | |
| 25 | 0.172 | | |
| 26 | 0.172 | | |
| 27 | 0.172 | | |
| 28 | 0.217 | | |
| 29 | 0.218 | | |
| 30 | 0.218 | | |

Anexo D. Espectro de absorción para la curva de calibración de quercetina



Anexo E. Absorbancias para curva de calibración de quercetina

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PAGI. 1

FECHA:12/05/15 SERIE No:140113 ID :
 HORA :14:21:28 OPERARIO :

SELEC. A:SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s
 CAMBIAR LAMP:325nm TIEMP RETRASO:00:00
 LONG. ONDA:257.0nm

| MUESTRA | ABS | MUESTRA | ABS |
|---------|-------|---------|-----|
| 1 | 0.265 | | |
| 2 | 0.415 | | |
| 3 | 0.627 | | |
| 4 | 0.868 | | |
| 5 | 1.070 | | |

Anexo F. Análisis estadístico del SPF

Pruebas de normalidad

| | Tipo de Subextracto | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------|---------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| SPF | Hexánico | ,350 | 3 | . | ,829 | 3 | ,186 |
| Subextractos | Clorofórmico | ,337 | 3 | . | ,855 | 3 | ,253 |
| | Acetato de Etilo | ,274 | 3 | . | ,945 | 3 | ,546 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

SPF Subextractos

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 10,242 | 2 | 6 | ,012 |

ANOVA

SPF Subextractos

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|------------|------|
| Entre grupos | 440,007 | 2 | 220,003 | 138725,661 | ,000 |
| Dentro de grupos | ,010 | 6 | ,002 | | |
| Total | 440,016 | 8 | | | |

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: SPF Subextractos

HSD Tukey

| (I) Tipo de Subextracto | (J) Tipo de Subextracto | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
|-------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------|------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Hexánico | Clorofórmico | -7,659333* | ,032516 | ,000 | -7,75910 | -7,55957 |
| | Acetato de Etilo | -17,096333* | ,032516 | ,000 | -17,19610 | -16,99657 |
| Clorofórmico | Hexánico | 7,659333* | ,032516 | ,000 | 7,55957 | 7,75910 |
| | Acetato de Etilo | -9,437000* | ,032516 | ,000 | -9,53677 | -9,33723 |
| Acetato de Etilo | Hexánico | 17,096333* | ,032516 | ,000 | 16,99657 | 17,19610 |
| | Clorofórmico | 9,437000* | ,032516 | ,000 | 9,33723 | 9,53677 |

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

Anexo G. Estudio de Niveles de SPF *in vitro* en protectores solares comerciales

TABLE II - SPF labeled and found in the commercially available samples

| Commercial sample (function) | Active Ingredient | Amount (%) | Labeled SPF | Found SPF* |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|--------------|
| A (Emulsion for body) | benzophenone-3 | 4.0 | 15.00 | 16.24 ± 0.05 |
| | octyl methoxycinnamate | 7.5 | | |
| B (Emulsion for body) | benzophenone-3 | 3.0 | 15.00 | 15.35 ± 0.06 |
| | octyl methoxycinnamate | 8.0 | | |
| C (Emulsion for body) | benzophenone-3 | 2.8 | 15.00 | 14.90 ± 0.03 |
| | octyl methoxycinnamate | 6.8 | | |
| | titanium dioxide and alkylbenzoate | 0.7 | | |
| D (Emulsion for body) | benzophenone-3 | 3.5 | 15.00 | 14.65 ± 0.04 |
| | octyl methoxycinnamate | 7.0 | | |
| | octyl salicylate | 2.0 | | |
| | titanium dioxide | 2.0 | | |
| E (Sunblock lotion) | benzophenone-3 | 2.1 | 8.00 | 12.20 ± 0.06 |
| | octyl methoxycinnamate | 5.7 | | |
| | titanium dioxide and alkylbenzoate | 0.6 | | |
| F (Emulsion for body) | benzophenone-3 | 1.5 | 8.00 | 10.94 ± 0.04 |
| | octyl methoxycinnamate | 5.5 | | |
| | octyl salicylate | 1.0 | | |
| | titanium dioxide | 1.0 | | |
| G (Emulsion for body) | benzophenone-3 | 2.75 | 15.00 | 13.65 ± 0.04 |
| | octyl methoxycinnamate | 6.5 | | |
| | octyl salicylate | 1.0 | | |
| | titanium dioxide | 1.0 | | |
| H (Emulsion for body) | benzophenone-3 | 5.0 | 30.00 | 19.00 ± 0.07 |
| | octyl methoxycinnamate | 7.5 | | |
| | octyl salicylate | 5.0 | | |
| I (Emulsion for body) | benzophenone-3 octyl methoxycinnamate; titanium dioxide and zinc oxide | Not specified | 20.00 | 14.15 ± 0.04 |
| J (Emulsion for face) | benzophenone-3 octyl methoxycinnamate octyl salicylate | Not specified | 23.00 | 20.3 ± 0.05 |

* Experimental data obtained in this research. M = 6

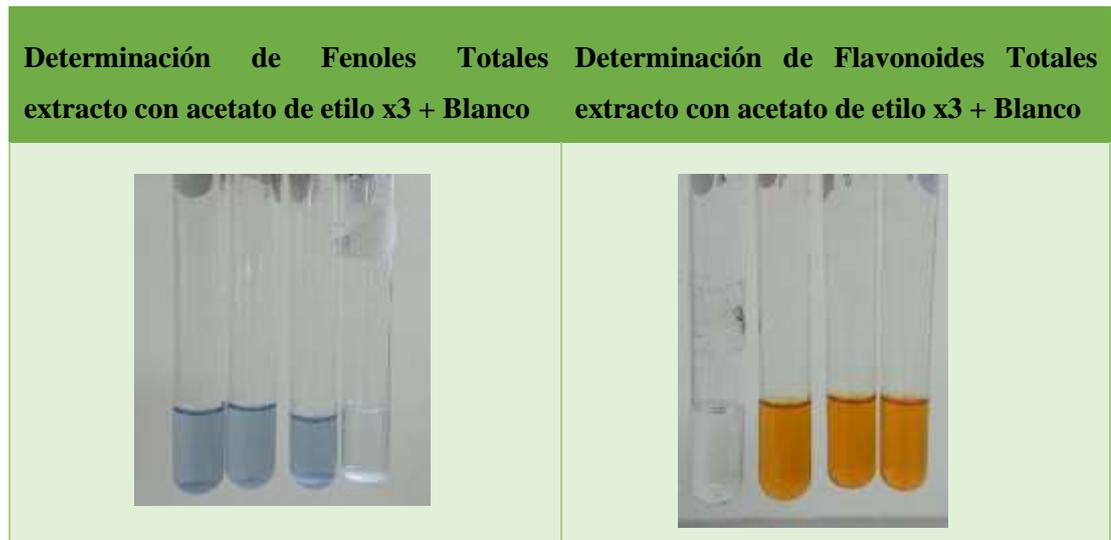
Anexo H. Estudio de niveles de SPF *in vitro* de protectores solares

In vitro SPF, UVA-PF and critical wavelength of sunscreens having the same label SPF 20 before and after natural sunlight exposure with erythral effective dose of 42 SEDs approximately.

| Sunscreen | SPF label | <i>In vitro</i> SPF | | UVA-PF | | Critical wavelength (nm) | |
|-----------|-----------|----------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Before (mean ± S.D.) | After sunlight exposure (mean ± S.D.) | Before (mean ± S.D.) | After sunlight exposure (mean ± S.D.) | Before | After sunlight exposure |
| S1 | 20 | 19.6 ± 1.5 | 9.2 ± 0.9 | 6.2 ± 0.3 | 1.9 ± 0.3 | 373 | 337 |
| S2 | 20 | 21.9 ± 1.8 | 12.3 ± 1.2 | 7.2 ± 0.4 | 2.8 ± 0.3 | 373 | 358 |
| S3 | 20 | 18.1 ± 1.2 | 15.9 ± 1.0 | 7.7 ± 0.3 | 6.6 ± 0.6 | 374 | 373 |
| S4 | 20 | 15.4 ± 1.4 | 12.4 ± 1.2 | 3.9 ± 0.2 | 3.7 ± 0.2 | 368 | 369 |
| S5 | 20 | 22.4 ± 1.1 | 12.6 ± 1.3 | 5.4 ± 0.3 | 2.6 ± 0.2 | 369 | 354 |
| S6 | 20 | 19.0 ± 1.4 | 9.8 ± 1.0 | 4.4 ± 0.4 | 1.8 ± 0.2 | 367 | 333 |
| S7 | 20 | 22.9 ± 3.0 | 14.5 ± 1.4 | 8.1 ± 0.3 | 4.3 ± 0.4 | 373 | 364 |
| S8 | 20 | 21.2 ± 0.8 | 18.6 ± 1.1 | 10.3 ± 0.6 | 9.4 ± 0.4 | 380 | 381 |
| S9 | 20 | 22.9 ± 1.1 | 11.3 ± 1.3 | 6.4 ± 0.3 | 2.4 ± 0.4 | 372 | 348 |
| S10 | 20 | 21.2 ± 0.4 | 20.5 ± 0.7 | 7.8 ± 0.3 | 7.5 ± 0.4 | 378 | 379 |
| S11 | 20 | 21.3 ± 1.1 | 16.7 ± 1.1 | 6.5 ± 0.5 | 4.8 ± 0.2 | 375 | 372 |
| S12 | 20 | 17.0 ± 0.9 | 13.8 ± 1.0 | 3.3 ± 0.2 | 3.1 ± 0.2 | 360 | 363 |
| S13 | 20 | 22.8 ± 1.1 | 18.3 ± 1.2 | 13.1 ± 0.5 | 9.2 ± 0.9 | 373 | 370 |
| S14 | 20 | 21.5 ± 1.0 | 13.1 ± 1.3 | 5.8 ± 0.3 | 3.2 ± 0.1 | 372 | 364 |
| S15 | 20 | 22.7 ± 1.2 | 20.6 ± 0.9 | 8.0 ± 0.4 | 6.9 ± 0.4 | 373 | 371 |

In vitro SPF value and UVA-PF value before and after exposure for each sunscreen tested is the mean three individual SPF values or UVA-PF values respectively for each PMMA plate covered with a sunscreen; S.D.: standard deviation. The bold numbers show when the UVA-PF value and the critical wavelength value satisfy the European Commission recommendation on the efficacy of sunscreen products [EC, 2006].

Anexo I. Cuantificación de flavonoides y fenoles totales



Anexo J. Verificación de absorbancias para determinar SPF



Anexo K. Preparación de agar Mueller Hinton y cultivo de *Escherichia coli* a diferentes tiempos de irradiación UV-B

Cultivo de *Escherichia coli*

Preparación de agar Mueller Hinton



Anexo L. *Escherichia coli* al cultivarse minutos después de irradiarse con UV-B, Estándar Pamidato-O (P-O) y Octilmetoxicinamato (OMC); Subextracto Hexánico (H), Clorofórmico (C) y con Acetato de etilo (Ac. E.)

