



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

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA
in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Chusquea sp

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: PROAÑO RODRÍGUEZ DIEGO MAURICIO

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

Riobamba – Ecuador

2017

©2017, Diego Mauricio Proaño Rodríguez

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

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

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Chusquea sp.*, de responsabilidad del señor Diego Mauricio Proaño Rodríguez, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc. DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	_____
Dra. Susana Abdo MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Dra. Adriana Rincón PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	_____	_____
DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH	_____	_____

Yo, Diego Mauricio Proaño Rodríguez soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

DIEGO MAURICIO PROAÑO RODRÍGUEZ

DEDICATORIA

A mis padres por el gran esfuerzo y sacrificio que han hecho para poder cumplir esta meta y enseñarme a nunca rendirme a pesar de todos los problemas, a mis hermanos por ser ese gran apoyo y ese motivo para seguir adelante, a mi sobrino por cambiarme la vida. A mi novia por apoyarme en el transcurso de esta carrera por estar en los buenos y malos momentos siendo mi fortaleza. A mis amigos que hemos compartido buenos momentos y que han aportado con palabras de aliento en momentos difíciles.

Diego.

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradecer a Dios por ayudarme a cumplir este sueño, por sus grandes bendiciones que ha derramado sobre mi familia.

A mi papá Jorge, el cual es mi amigo y mi ejemplo a seguir, el que me ha enseñado y dirigido mi camino, el que me ha inculcado buenas cosas desde pequeño, todo tu esfuerzo lo ves reflejado aquí cumpliendo por lo que tanto trabajaste.

A mi mamá Angelita por todo el sacrificio que ha hecho por la familia, la que me ha consentido en lo que ha podido y enseñarme siempre de dónde venimos, a pesar de lo que hemos pasado siempre estaré orgulloso de lo que haces.

A mi hermano Daniel por todos los momentos compartidos desde pequeños por las peleas y por el gran fútbol que jugamos ahora, algo que siempre nos unió, a mi hermana Belén mi mamá pequeña la que me ha hablado y me ha cuidado siempre y gracias por darnos al pequeño Ney, esa bendición que cambió mi vida y el motivo que nos unió más como familia.

A mis abuelitos mis ángeles que me han cuidado siempre y los que más extraño, gracias por todo su cariño y amor.

A mi tía Martha, mis primos David y Miguel por todo el apoyo que me han dado desde mi niñez.

A mi novia Vero que ha sido una de mis mayores fortalezas la que me ha motivado siempre para llegar al final de esta meta, la que me ayudado en toda circunstancia y me ha brindado su mano o un abrazo en los malos momentos, ha cambiado mi vida y se que vamos a cumplir los sueños que tenemos juntos.

A todos mis amigos que hice durante la carrera por su gran amistad incondicional y por los grandes momentos vividos que siempre recordaremos.

Al BQF. Diego Vinuesa por el apoyo brindado durante la investigación y durante las materias compartidas ya que sus aportes fueron valiosos, y por enseñarnos a seguir superándonos en la vida.

Diego

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
DERECHO DE AUTOR.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DERECHOS INTELECTUALES.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Radiación UV.....	3
<i>1.1.1. Radiación UVA.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Radiación UVB.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3. Radiación UVC.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.4. Efectos de la radiación UV sobre la salud.....</i>	<i>4</i>
1.2. Efectos Biológicos de la radiación UV	4
<i>1.2.1. Pigmentación de la Piel.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2. Estimulación de la queratogénesis.</i>	<i>5</i>
<i>1.2.3. Fotoenvejecimiento</i>	<i>5</i>
<i>1.2.4 Acción carcinogénica</i>	<i>6</i>
1.3. Fotoprotección.....	6
<i>1.3.1. Índice Solar</i>	<i>6</i>
1.3.2. Fotoprotectores.....	8
<i>1.3.3. Antioxidantes</i>	<i>10</i>
<i>1.3.4. Flavonoides</i>	<i>10</i>
<i>1.3.5 Mecanismos de protección de las plantas.....</i>	<i>11</i>
1.4. Muerte celular inducida	12

1.5.	Factor de protección solar	12
1.6.	Plantas C4	13
1.7.	Liofilización	15
1.8.	Chusquea.....	15

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO.....	17
2.1.	Lugar de recolección de la muestra	17
2.2.	Lugar de investigación.....	17
2.3.	Descripción botánica	17
2.4.	Control de calidad de la materia vegetal.....	17
2.4.1.	Determinación del Contenido de Humedad.....	17
2.4.2.	Determinación de Cenizas Totales.....	18
2.4.3.	Determinación de Cenizas Solubles en Agua	19
2.4.4.	Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico	20
2.5.	Tamizaje Fitoquímico	21
2.6.	Obtención del extracto seco de Chusquea sp.....	21
2.7.	Preparación de los subextractos	22
2.8.	Estándar de Mcfarland.....	22
2.9.	Efecto protector frente a la radiación UVB por muerte celular inducida	22
2.10.	Factor de protección solar	23
2.11.	Cromatografía en capa fina.....	24
2.12.	Cuantificación de flavonoides totales	24
2.13.	Barrido por Espectrofotometría UV	25

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS..	26
3.1.	Extracto seco.....	26
3.2.	Control de calidad del material vegetal.....	26

	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	26
	<i>Determinación de Cenizas Totales</i>	27
	<i>Determinación de Cenizas Solubles en Agua</i>	27
	<i>Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico</i>	27
3.3.	Tamizaje Fitoquímico	28
3.4.	Efecto protector frente a la radiación UVB por muerte celular inducida	29
	<i>Extracto etanólico de Chusquea sp 20 ppm</i>	33
	<i>Extracto etanólico de Chusquea sp 200 ppm</i>	33
	<i>Extracto etanólico de Chusquea sp 200 ppm</i>	34
3.5.	Factor de protección solar	36
3.6.	Cromatografía de capa fina	38
3.7.	Cuantificación de flavonoides totales	40
3.8.	Barrido por Espectrofotometría UV	41
	CONCLUSIONES	46
	RECOMENDACIONES	47
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Categorías de exposición a la radiación UV.....	7
Tabla 2-1: Categorías de fotoprotección.....	13
Tabla 3-1: Taxonomía <i>Chusquea</i>	16
Tabla 1-2: Preparación de estándar McFarland.....	22
Tabla 1-3: Resultados contenido de humedad.....	26
Tabla 2-3: Resultados del contenido de cenizas.....	27
Tabla 3-3: Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.....	28
Tabla 4-3: Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.....	28
Tabla 5-3: Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.....	29
Tabla 6-3: UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de <i>Chusquea sp</i> , a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.....	30
Tabla 7-3: UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de PAMIDATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.....	31
Tabla 8-3: UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de OCTILMETOXICINAMATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.....	32
Tabla 9-3: Porcentaje de tasa de viabilidad celular total.....	33
Tabla 10-3: Determinación del FPS de <i>Chusquea sp</i>	36
Tabla 11-3: Determinación del FPS de Pamidato.....	37
Tabla 12-3: Determinación del FPS de Octilmetoxicinamato.....	37
Tabla 13-3: Comparación de los resultados de la cromatografía con los compuestos de referencia.....	39
Tabla 14-3: Cuantificación de Flavonoides Totales del extracto etanólico de <i>Chusquea sp</i> expresados en porcentaje de equivalentes de quercetina por miligramo.....	40

ÍNDICE DE FIFURAS

Figura 1-1	Índice de radiación en Quito.....	8
Figura 2-1	Estructura de los principales Flavonoides.....	11
Figura 3-1	Vía de Hatch y Slack presente en las plantas C4.....	14
Figura 1-2	Valores de EE X I.....	24
Figura 1-3	Placa Cromatográfica del extracto etanólico <i>Chusquea sp</i>	39
Figura 2-3	Esqueleto de flavonoide presentado por el sistema cinamoil y benzoil.....	42
Figura 3-3	Valores de absorción de los diferentes tipos de flavonoides en Bandas BI y BII.....	43
Figura 4-3	Espectro de solución acuosa de Pamidato.....	44
Figura 5-3	Espectro de solución etanólica de Pamidato.....	44
Figura 6-3	Espectro de solución acuosa de octilmetoxicinamato.....	45
Figura 7-3	Espectro de solución etanólica de Octilmetoxicinamato.....	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3 UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de <i>Chusquea sp</i> , a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.....	30
Gráfico 2-3 UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de PAMIDATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.....	31
Gráfico 3-3 UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de OCTILMETOXCINAMATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.....	32
Gráfico 4-3 Porcentaje de tasa de viabilidad celular total.....	33
Gráfico 5-3 UFC sobrevivientes bajo la protección de <i>Chusquea sp</i> vs tiempo de exposición a radiación UVB.....	34
Gráfico 6-3 UFC sobrevivientes bajo la protección de Pamidato vs tiempo de exposición a radiación UVB.....	35
Gráfico 7-3 UFC sobrevivientes bajo la protección de Octilmetoxicinamato vs tiempo de exposición a radiación UVB.....	35
Gráfico 8-3 Comparación FPS determinados por la Ecuación de Mansur.....	40
Gráfico 9-3 Espectro de solución acuosa de <i>Chusquea sp</i>	41
Gráfico 10-3 Espectro de solución alcohólica de <i>Chusquea sp</i>	41
Gráfico 11-3 Espectro de solución clorofórmica de <i>Chusquea sp</i>	42

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la actividad fotoprotectora de la especie vegetal Carrizo (*Chusquea sp*), la cual posee un mecanismo fotosintético C4 y desarrollo en varios ecosistemas. Con el paso del tiempo se ha producido un incremento del índice UV en el Ecuador que ha derivado en una mayor incidencia de cáncer de piel. Para evaluar la propiedad fotoprotectora se realizó el método de muerte celular inducida frente a la radiación UVB utilizando cepa de *Escherichia coli* ATCC (29522), como barrera el extracto etanólico de la planta y los controles Pamidato y Octilmetoxicinamato (OMC), a concentraciones de 20 ppm, 200 ppm y 2000 ppm, formando así la unidad experimental, se observó las colonias bacterianas sobrevivientes a los diferentes tiempos de exposición y se transformaron en porcentaje de viabilidad celular para su comparación. El Factor de protección solar (FPS) se lo determinó mediante la metodología de Mansur, igualmente se estableció la cantidad de flavonoides totales presentes en el extracto etanólico de la especie. Se realizó la cromatografía de capa fina (TLC) utilizando sistema de solventes para la identificación de flavonoides. Se comprobó que a una concentración de 2000 ppm el extracto etanólico de Chusquea tiene una tasa de viabilidad celular de 10,62% presentando la mayor capacidad fotoprotectora y teniendo un FPS de 6,11 a 10 ppm, en la cromatografía se identificaron 3 posibles compuestos Quercetin-3-O-gentiobioside, Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside y Isorhamnetin-3-O-glucoside. Se logró determinar que esta especie vegetal tiene un nivel de protección medio, con lo que se podría utilizar en formulaciones farmacéuticas cosméticas sin embargo se recomienda complementar con otras sustancias fotoprotectoras para aumentar su rango de protección.

PALABRAS CLAVES: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOQUÍMICA>, <CARRIZO ECUATORIANO (*Chusquea sp*)>, <RADIACION ULTRAVIOLETA B (UVB)>, <ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA>, <FACTOR DE PROTECCION SOLAR (FPS)>, <PLANTAS C4>.

SUMMARY

In the present research work determined the protective activity of the plant species Carrizo (*Chusquea sp*), which has a photosynthetic mechanism C4 and development in several ecosystems. Over time has produced an increase of UV index in Ecuador, resulting in a higher incidence of skin cancer. To evaluate the protective quality carried in order the cell death method against UVB radiation by using *Escherichia coli* ATCC (29522) as well as the ethanolic extract of the plant used as a barrier, the Pamidato and Octylmethoxycinnamate (OMC) controls at concentrations of 20 ppm, 200 ppm and 2000 ppm; thus forming the experimental unit. On the other hand, it observed surviving bacterial colonies at different exposure times and transformed into percent cell wall for comparison. The sun protection factor (SPF) was determined through the Mansur methodology; at the same time the amount of total flavonoids in the ethanolic extract. The thin layer chromatography (TLC) was performed using a solvent system for the identification of flavonoids, besides it verified that a concentration of 2000 ppm of the ethanolic extract of *Chusquea* has a rate of feasibility of 10, 62 % presenting the mayor protective capacity and obtaining a SPF of 6, 11 to 10 ppm. In the chromatography, 3 possible compounds were identified such as: Quercetin-3-O-gentiobiside, kaempferol-3-O-rhamnoglucoside and Isorhamnetin-3-O-glucoside. It the determined that this plant species has a medium level of protection, which could be used in cosmetic pharmaceutical formulations however, it recommends to complement with other protective substances to increase its range of protection.

KEY WORDS: < EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY>, <CARRIZO (*Chusquea sp*)>, <ULTRAVIOLET RADIATION B (UVB)>, <PHOTOPROTECTING ACTIVITY>, <SOLAR PROTECTION FACTOR (SPF) >, <PLANT C4>.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la radiación solar ha alcanzado una mayor intensidad sobre la superficie de la tierra, debido a una contaminación ambiental que conlleva a la disminución de la capa de ozono, la emisión solar se encuentra constituida aproximadamente por el 50% que corresponde a luz visible con una longitud de onda de 400-800 nm, un 40% a radiación infrarroja (IR) que va de 1300-1700 nm, y un 10% a radiación ultravioleta (UV) que va de 10-400 nm. La UV se fracciona en radiación UV-A que va de 320 hasta 400 nm, y radiación UV-B que va de 290 hasta 320 nm. (Avila Acevedo et al. 2005)

La radiación UVB consigue penetrar en la epidermis produciendo efectos biológicos adversos como estimulación de la síntesis de DNA, estrés oxidativo, detención del ciclo celular, foto-carcinogénesis y foto-envejecimiento prematuro. Una elevada y continua exposición a radiación UVB reduce la capacidad defensiva de las enzimas antioxidantes, disminuye el sistema inmune e induce cáncer en la piel de tipo escamoso y carcinoma de células basales. (Úmariega et al. 2009)

La radiación UVA penetra profundamente en la epidermis y en la dermis de la piel produciendo oscurecimiento de la melanina, si la piel es sometida a una exposición prolongada se puede quemar, daño en estructuras, foto-envejecimiento prematuro de la piel y otros efectos más graves como dañar el sistema inmunológico, daño estructural al DNA y formación de cáncer. (Úmariega et al. 2009)

El venezolano Erik Quiroga indicó que, “El desplazamiento de la capa de ozono del Ecuador hacia los Polos dejó sin protección las regiones ecuatoriales y aumentó el riesgo de que se multipliquen los casos de cáncer de piel” Según investigaciones “Los habitantes de los Andes de Ecuador, Perú y Colombia reciben a diario niveles de radiación ultravioleta extremos debido al deterioro de la capa de ozono en la franja ecuatorial, lo cual convierte el área en una de las más afectadas del planeta, ya que por cada mil metros sobre el nivel del mar, aumenta un 10 por ciento la radiación ultravioleta "(El Comercio 2009)

La Organización Mundial de la Salud establece que para el ser humano el índice UV tolerable es de 11 W/m², en la ciudad de Quito se han reportado índices UV desde 16 que en varias ocasiones ha llegado a 25 W/m², y en la ciudad de Guayaquil se ha detectado índices superiores a 14, todo esto informado por la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA) en su informe HIPERIÓN del 22 de octubre de 2008.(Castillo 2010)

Una de las principales causas de muerte en todo el mundo es el cáncer según la OMS. Se estima que en el 2008 alrededor de 7,6 millones de personas perecieron por esta patología, representando aproximadamente un 13% del total de defunciones. (Ministerio de Salud Pública 2013) En Ecuador mediante las tasas estandarizadas de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer, para Guayaquil en el año 2010 se detectaron un 22,81% casos de melanoma de piel en mujeres y un 27,81% en hombres, constituyéndole el segundo tipo de cáncer con mayor frecuencia. (Solca 2011)

Se deben tomar medidas para contrarrestar los efectos de la radiación con el uso de filtros solares que contengan sustancias químicas que protejan la piel contra la radiación UV-A y UV-B, a eso el interés por desarrollar protectores solares con compuestos naturales que han sido tema de varios estudios debido a la seguridad que presentan. (Elmets et al. 2001)

La familia Poaceae presenta componentes químicos como flavonoides, sustancias cianogénicas, ácidos fenólicos, saponinas, terpenoides, los cuales se extraerá para su determinado estudio como actividad fotoprotectora, estas plantas crecen en la zona ecuatorial a elevadas alturas, y sus compuestos se considera como un potencial agente fitocosmécutico en la protección solar, ya que son producidos por las plantas como mecanismo de defensa contra la elevada radiación UV-A y UV-B a la que están expuestas. (Vega 2001)

Es de gran importancia buscar solución temprana al problema ya que si no se lo realiza las secuelas pueden ser que los casos detectados de cáncer de piel aumenten o existan otras complicaciones de salud por los compuestos químicos utilizados en la fabricación de productos solares, se beneficiara a la población ecuatoriana mediante el cumplimiento del objetivo 3 del plan de vivir el cual es mejorar la calidad de vida de la población.

El objetivo de esta investigación es determinar el efecto protector in vitro de la especie vegetal *Chusquea sp.*, la cual está dentro del grupo de las plantas C4, que poseen características adecuadas contra la radiación ya que crecen en varios ecosistemas y a diferentes altitudes, mediante sus componentes químicos se determinaran ensayos para comprobar su propiedad de filtro UVB

La presente investigación tendrá lugar en el Laboratorio de Recursos Naturales de la Facultad de ciencias de la ESPOCH, el mismo que posee los materiales necesarios para llevar a cabo el método propuesto por AVILA ACEVEDO.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Radiación UV

La radiación ultravioleta (UV) forma parte del espectro electromagnético emitido por el sol. La región ultravioleta está compuesta por radiación UVA (320-400 nm), la cual se encuentra más próxima a la región visible del espectro; radiación UVB (280-320 nm) y radiación UV-C (su longitud de onda menor a 280 nm). (Salazar 2013)

Para la salud humana los rayos UVA y UVB en pequeñas cantidades, poseen un grado de importancia, ya que una de sus funciones es la producción de vitamina D en el ser humano, sin embargo, una exposición prolongada puede provocar efectos agudos y crónicos en la piel, los ojos y el sistema inmunológico. (Organizacion Mundial de la Salud 2003)

1.1.1. Radiación UVA

La radiación ultravioleta A (UVA) es la parte con menor capacidad energética de la radiación UV, alcanza longitudes de onda entre 320 y 400 nm. Se emplea comercialmente en el ámbito del bronceado debido a su capacidad de producir en la piel un mínimo eritema. Además se ha utilizado para el tratamiento de la psoriasis. (Portero 2008)

1.1.2. Radiación UVB

La radiación ultravioleta B (UVB) no es recomendado para el bronceado, ya que su longitud de onda se encuentra de 290 a 320 nm. Tras su exposición es probable que produzca en la piel eritemas y quemaduras. Su uso exclusivo es para el tratamiento de psoriasis, Goeckerman y tratamiento del prurito urémico. (Portero 2008)

1.1.3. Radiación UVC

La radiación ultravioleta C (UVC) es la porción con mayor capacidad energética de la radiación UV, su longitud de onda se encuentra de 200 a 290 nm, Cuando alcanza la atmósfera soporta una fuerte dispersión, por lo que se cree que no está presente a nivel del mar. Debido a su acción bactericida sus fuentes artificiales se aprovechan para el tratamiento de las micosis fúngicas y las úlceras de decúbito. (Portero 2008)

1.1.4. Efectos de la radiación UV sobre la salud.

De la radiación UV que atraviesa la superficie de la tierra, los rayos UVA representan hasta el 95 por ciento de la radiación total, su prevalencia es mayor que los rayos UVB, se encuentran presentes durante todas las horas del día y su mayor peligro que pueden penetrar vidrios y nubes. (Epstein y Wang 2013)

Se ha demostrado que el bronceado prolongado al aire libre o en una habitación, presenta problemas como daño al ADN de la piel, en su intento de evitar un mayor daño en el ADN la piel se oscurece, implantando imperfecciones o mutaciones, que pueden provocar carcinoma de piel. (Epstein y Wang 2013)

La principal causa de enrojecimiento y quemaduras solares, son los rayos UVB ya que su daño se refleja en las capas epidérmicas más superficiales de la piel. Contribuye en el fotoenvejecimiento y juega un papel muy importante en el desarrollo de cáncer de piel. Su intensidad varía de acuerdo a la ubicación, hora del día y temporada. (Epstein y Wang 2013)

A mayores altitudes y en superficies reflectantes como el hielo, los rayos UVB pueden producir daños en la piel durante todo el año. Los rayos UVB no penetran de manera significativa el vidrio. (Epstein y Wang 2013)

1.2. Efectos Biológicos de la radiación UV

La luz solar dependiendo de su intensidad puede inducir varios efectos biológicos en el ser humano como los rayos UVB que pueden ser genotóxicos, causando daño al ADN, puede aumentar el estrés oxidativo e inducir la inflamación y la inmunosupresión. (Ferreira Cestari, Bazanella de Oliveira y Catucci Boza 2012)

Las continuas exposiciones a radiación UVA se encuentran relacionadas con el daño celular oxidativo que lleva al daño del ADN, alteraciones del tejido conectivo dérmico y epidérmico, y el engrosamiento del estrato córneo, estos factores están involucrados en el proceso de fotoenvejecimiento y en diversas etapas de la carcinogénesis. (Ferreira Cestari, Bazanella de Oliveira y Catucci Boza 2012)

1.2.1. Pigmentación de la Piel

La epidermis presenta un complejo mecanismo protector de la radiación solar. Tradicionalmente se ha considerado la melanina como el verdadero y único filtro para la radiación UV, aunque cada vez se le concede más importancia como filtrante solar a los queratinocitos, lípidos y proteínas epidérmicas. (Capote, Lòpez y Tania 2009)

Los UVA producen también una transferencia inmediata de melanina, desde los melanosomas, hasta los queratinocitos. Los primeros días de exposición al sol, el número de melanosomas y la concentración de gránulos de melanina son escasos, por lo que este efecto tiene un resultado pasajero y desaparece tras varias horas. (Capote, Lòpez y Tania 2009)

La radiación UVB es la causante del verdadero bronceado, pigmentación verdadera o melanogénesis, aunque produce también una pigmentación directa por fotooxidación no enzimática, denominada pigmentación retardada, con inicio a las 24 h (máximo a las 100 h) y desaparición a las 160 h. (Capote, Lòpez y Tania 2009)

1.2.2. Estimulación de la queratogénesis.

La radiación UVB estimula la mitosis de los queratinocitos y produce engrosamiento del estrato córneo, que puede triplicarse a las 72 h de exposición solar y actúa como defensa frente a la radiación. A las 6 semanas de abandonar la exposición, el grosor epidérmico desciende hasta niveles normales. (Capote, Lòpez y Tania 2009)

1.2.3. Fotoenvejecimiento

El fotoenvejecimiento consiste en los cambios en apariencia y funciones de la piel como resultado de una exposición solar repetida, más que por el simple paso del tiempo. Este complejo proceso implica la interacción de muchos elementos, incluyendo metaloproteinasas, citocinas, ROS y otros mediadores de la inflamación sobre distintas estructuras celulares y extracelulares cutáneas. (Gilaberte et al. 2003)

Los cambios más importantes del fotoenvejecimiento se producen en la dermis, y se caracterizan por la presencia de material basófilo en la dermis media y superficial, fenómeno conocido como elastosis. (Gilaberte et al. 2003)

1.2.4. Acción carcinogénica

Las longitudes de onda en la región UVB del espectro solar se absorben en la piel, produciendo eritema, quemaduras y, finalmente, cáncer de piel. Aunque UVA es el componente predominante de la radiación solar UV a la que estamos expuestos, se supone que es débilmente cancerígeno, y causa envejecimiento y arrugas de la piel. El grado de pigmentación en la piel y la capacidad de bronceado son factores de riesgo importantes en el desarrollo del cáncer de piel y el riesgo de NMSC es más alto en las personas que se queman fácilmente y broncean mal. (Matsumura y Ananthaswamy 2004)

La exposición prolongada y recurrente a la luz solar causa el deterioro gradual de la estructura y función cutánea. Aparentemente ocurre como resultado del daño acumulativo del ADN resultante de la lesión aguda recurrente del ADN y de los efectos de la inflamación crónica. Esos daños actínicos podrían conducir en última instancia al desarrollo de cánceres de piel, que es un proceso de varios pasos que implica la inducción de mutaciones y el escape de la vigilancia inmune. (Matsumura y Ananthaswamy 2004)

1.3. Fotoprotección

El sol es imprescindible para la vida y tiene efectos muy beneficiosos sobre el organismo. Además de presentar efectos positivos sobre el humor, tomado con moderación puede ser útil para conservar nuestra vitalidad, rejuvenecer o recobrar la sensación de salud. Sin olvidar los efectos que ejerce sobre los distintos procesos metabólicos, como por ejemplo el estímulo de la vitamina A o la D. También se ha relacionado con la eliminación de toxinas, con la paliación de dolores y con el incremento de las defensas contra microorganismos. (Castro 2003)

Las radiaciones solares tienen un efecto acumulativo sobre la piel, cuanto antes se inicie la correcta aplicación de las medidas de fotoprotección, mejor se cumplirán los objetivos de prevención tanto del fotoenvejecimiento como del cáncer de piel. (Castro 2003)

1.3.1. Índice Solar

El índice UV solar mundial (IUV) es una medida de la intensidad de la radiación UV solar en la superficie terrestre. El índice se expresa como un valor superior a cero, y cuanto más alto, mayor es la probabilidad de lesiones cutáneas y oculares y menos tardan en producirse esas lesiones. Los valores del IUV se dividen en categorías de exposición. (Organización Mundial de la Salud 2003)

Tabla 1-1: Categorías de exposición a la radiación UV

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

Fuente: Organización Mundial de la Salud

Realizado por: Diego Proaño, 2017

En el informe Hiperión del 22 de Octubre de 2008 por parte de la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana se ha informado sobre el índice solar de exposición en Ecuador, teniendo un valor máximo de 14 para la ciudad de Guayaquil y de 24 para Quito, los cuales superan altamente la categoría propuesta por la OMS, esto se debe a varios factores que inciden, como la hora de exposición al sol, siendo de 10:00 am hasta 15:00 pm, las horas donde se reportan un mayor índice, alcanzando los picos máximos como se muestra en el gráfico 1-1, otro factor importante es la altitud siendo la subregión andina la más afectada debido a que la radiación ultravioleta aumenta un 10 % por cada mil metros sobre el nivel del mar, la radiación que recibimos es la más potente en todo el mundo debido a su cantidad y potencia, presentando un gran problema para la población Ecuatoriana.

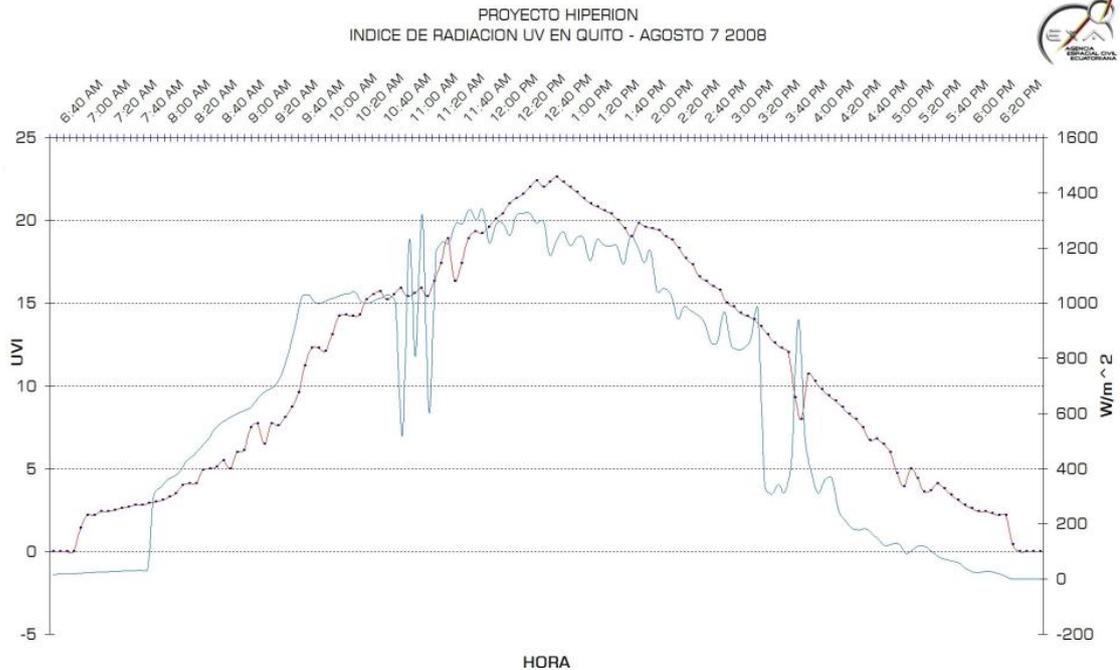


Figura 1-1. Índice de radiación en Quito

Fuente: Agencia Espacial Civil Ecuatoriana 2008

1.3.2. Fotoprotectores

Los fotoprotectores contienen moléculas o complejos moleculares que pueden absorber, reflejar o dispersar fotones de radiación UV. Para prevenir el eritema y la quemadura solar es necesaria una protección frente a la radiación UVB, es decir fotones altamente energéticos; sin embargo el fotoenvejecimiento es causado fundamentalmente por la radiación UV de baja energía (UVA). Por ello, un fotoprotector novedoso es aquel que puede prevenir, mejorar o incluso reparar los daños cutáneos inducidos por la radiación solar. (Gilaberte y González 2010)

Sus efectos protectores incluyen:

- 1) absorción directa de fotones.
- 2) inhibición de la inflamación crónica.
- 3) modulación de la inmunosupresión.
- 4) inducción de apoptosis.
- 5) actividad antioxidante directa.
- 6) antioxidante indirecta. (Gilaberte y González 2010)

1.3.2.1. *Filtros Físicos*

Su naturaleza es inorgánica y su función es desviar, reflejar o dispersar la radiación solar, produciendo un efecto de pantalla contra los rayos UVA, UVB e incluso IR. La ventaja que destaca es su seguridad y estabilidad. Las partículas micronizadas de mayor utilización son el dióxido de titanio y el óxido de cinc. (Bernabéu 2007)

1.3.2.2. *Filtros orgánicos o químicos*

Son moléculas orgánicas que captan la energía incidente y la emiten como radiación térmica, inocua para la piel, debido a su estructura poseen un alto coeficiente de absorción molar en la zona UV. Poseen la ventaja de ser más fluidas y una mejor absorción por la piel lo que permite su transpiración, pero requieren un mayor margen de seguridad ya que se han descrito efectos secundarios de su utilización como reacciones alérgicas. (Tarazona 2015)

1.4. **Plantas y efectos**

Una de las familias más importantes y de mayor estudio es Poaceae debido a su composición química en los cuales varios autores han identificado

- Compuestos Fenólicos como: p-hidroxibenzoico, siringal, vanílico, ferúlico, P-cumárico, clorogénico, cafeico, p-hidroxibenzaldehído, gálico.
- Ácidos Hidroxámicos como: BOA, DIBOA, DIMBOA, AZOB, DIMBOA-glc, MBOA, CIMBOA.
- Alcaloides como: hordenina y gramine
- Quinonas: La más importante y estudiada es la sorgoleona, también se ha identificado P-benzoquinonas. (Sanchez-Moreiras, Weiss y Reigosa-Roger 2004)

En la investigación propuesta por Durango E, Contreras A, Cabrera C, sobre el estudio para el aprovechamiento potencial de hojas de *guadua angustifolia kunth* (Poaceae), para el sector cosmético, se identificaron metabolitos secundarios como cardiotónicos, aminoácidos, triterpenoides, esteroides, flavonoides y compuestos fenólicos, lo que corrobora con la información sobre esta familia, cabe recalcar que esta especie vegetal es de la subfamilia *Bambusoideae*, a la cual también pertenece la planta estudiada en la presente investigación. (Álvarez, Cabrera y Contreras 2015)

A continuación se describe los metabolitos secundarios implicados en el efecto fotoprotector contra la radiación solar.

1.4.1. Antioxidantes

Los antioxidantes actúan frenando o reparando procesos oxidativos como peroxidación lipídica, alteración de proteínas estructurales y daños en el ADN que son generados básicamente por la radiación UVA, pero su capacidad de bloqueo frente a los rayos UVB es muy limitada. Este hecho no excluye que los antioxidantes actúen como fotoprotectores, ya que protegen a la piel de procesos intermedios celulares y moleculares lesivos para la misma y donde los fotoprotectores tópicos con FPS muy elevado no pueden actuar. (De Gálvez 2010)

1.4.2. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente difundidos en plantas y alimentos de origen vegetal, abarcan un gran grupo de sustancias polifenólicas que poseen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, antialérgicas, antimutagénicas, antivirales, antineoplásicas y vasodilatadores. (Mujwah, Mohammed y Ahmed 2010)

La estructura general de los Flavonoides comprende un anillo A derivado de la cadena policétida, un anillo B, derivado del ácido Shikímico, con sustitución en orto, los dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo que en caso de existir es llamado anillo C, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano. (Dominguez 1979) Se han identificado más de 5.000 flavonoides, que poseen algún efecto fotoprotector, ya sea en mayor o menor proporción. (Lock 1994)

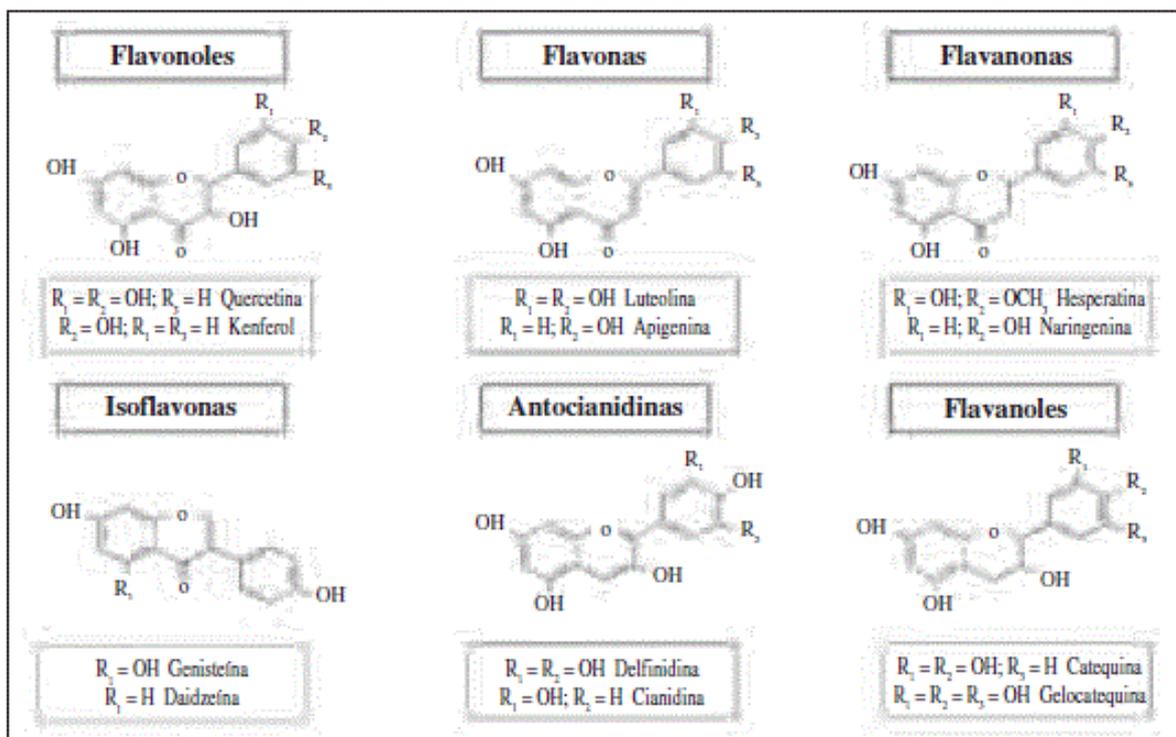


Figura 2-1. Estructura de los principales Flavonoides

Fuente: Farfán, Oliva y Jayes 2012

Las plantas al encontrarse en condiciones de estrés o diferentes compartimentos celulares, acumulan pigmentos como los flavonoides, los cuales atenúan la radiación UV. Su mecanismo implica principalmente la capacidad de los flavonoides para eliminar los radicales libres y especies reactivas de oxígeno. (Dall'Acqua et al. 2012)

Para ser eficaz en su acción fotoprotectora, un protector solar debe tener un espectro de absorción lo suficientemente amplia para cubrir como muchas de las longitudes de onda de la región UV como sea posible, y debe ser estable bajo una exposición prolongada a la luz UV. El anterior requisito se cumple por la mayoría de los flavonoides. (Dall'Acqua et al. 2012)

1.4.3. Mecanismos de protección de las plantas

Se han identificado los siguientes mecanismos de protección de las plantas contra el exceso de radiación, primeramente los que tienen la capacidad de provenir la absorción de luz excesiva mediante el desarrollo de estructuras reflectantes en la epidermis como las ceras y mediante movimientos foliares paraheliotrópicos, otros disipan el exceso de energía absorbida y eliminan sus especies tóxicas formadas. (Tambussi 2012)

Las plantas pueden responder a condiciones ambientales adversas mediante la producción de compuestos polifenólicos, los cuales se acumulan en las células de la epidermis y absorben la radiación UVB y no interfieren con la absorción de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), también cumplen con otra función como captadores de radicales libres, el caso de luteolina y quercetina, cumpliendo este tipo de flavonoides con dos funciones de protección contra los efectos nocivos de la radiación. (Mejía-Giraldo, Atehortúa y Puertas-Mejía 2014)

1.5. Muerte celular inducida

A determinadas condiciones fisiológicas como patológicas las células en respuesta inducen su muerte mediante un proceso celular genético controlado por varias etapas, en sus etapas iniciales siendo irreversible, como ejemplo cuando se presenta una infección las células que ayudaron a combatir, dejan de ser útiles y son eliminadas por apoptosis.

La radiación UV produce cambios biológicos en las células, dependiendo del tiempo de exposición y la cantidad absorbida, produciendo daños como lisis celular y daño en el material genético.

1.6. Factor de protección solar

El Factor de Protección Solar (FPS), nos indica el número de veces que el fotoprotector aumenta la capacidad de defensa natural de la piel frente al eritema o enrojecimiento previo a la quemadura, por lo que nos está dando información sobre la protección frente al UVB.

La industria cosmética utiliza diferentes metodologías para determinar el FPS, por lo que, dependiendo de la procedencia de los cosméticos, podemos encontrar diferentes índices no comparables entre sí:

- FDA o americano, vigente en Estados Unidos.
- DIN o alemán.
- COLIPA o método europeo, aceptado por casi todos los fabricantes de cosméticos europeos, aunque no de aplicación obligatoria. Es el más ampliamente utilizado en la actualidad.

Para calcular el FPS, se valora la dosis mínima de radiación ultravioleta que produce la primera reacción eritemática, perceptible en la piel humana, mínima dosis eritemática (MED). La cual se determina con y sin protección. La relación entre ambas es el FPS.

$$FPS = \frac{MED \text{ con protección}}{MED \text{ sin protección}}$$

Los datos que se obtienen y que figuran en los etiquetados no tienen en cuenta otros factores como la transpiración, la incorrecta aplicación del producto, la intensidad de las radiaciones y el lugar de exposición al sol.

Las tendencias actuales, utilizando el método COLIPA clasifican los productos en varios tipos o categorías, en función del factor de protección solar (FPS):

Tabla 2-1: Categorías de fotoprotección

TIPO DE FOTOPROTECTOR	FPS
BAJO	2-4-6
MEDIO	8-10-12
ALTO	15-20-25
MUY ALTO	30-40-50
ULTRA	50+

Fuente: COLIPA, 2012

1.7. Plantas C₄

Las plantas C₄ se ven favorecidas en condiciones de alta temperatura y baja humedad relativa, que son las predominantes en los climas tropicales y subtropicales, relativamente áridos, de las regiones de donde son originarias. Las plantas C₄ constituyen un grupo importante de especies, por lo general adaptadas precisamente a ambientes con altas temperaturas, iluminación intensa y escasez de agua; las especies C₄ pertenecen a unas cuantas familias de Angiospermas, entre las que destacan las Gramíneas, Amarantáceas, y Quenopodiáceas. (Universidad Politécnica de Valencia 2003)

El primer paso, llevado a cabo por la enzima PEP carboxilasa es la adición de CO₂ al fosfoenolpiruvato (PEP), para formar el producto de cuatro carbonos oxalacetato. La PEP carboxilasa tiene mucha mayor afinidad por el CO₂, que las rubisco y ninguna afinidad por el O₂. Por tanto, PEP carboxilasa puede fijar seis carbonos eficientemente cuando la rubisco no puede. Después de que la planta C₄, fija el carbono del CO₂, las células mesófilas exportan sus productos de cuatro carbonos a las células de la vaina fascicular a través del plasmodesmo. (Campbell y Reece 2007)

Dentro de las células de la vaina fascicular los compuestos de carbono liberan CO_2 , que es asimilado en material orgánico por la rubisco y el ciclo de Calvin. Las células mesófilas de una planta C4, bombean CO_2 dentro de la vaina fascicular y mantienen la concentración de CO_2 , en las células de la vaina fascicular lo suficientemente alta para que la rubisco se una al dióxido de carbono en lugar de al oxígeno. De esta forma, la fotosíntesis C4, minimiza la fotorespiración e incrementa la producción de azúcar. (Campbell y Reece 2007)

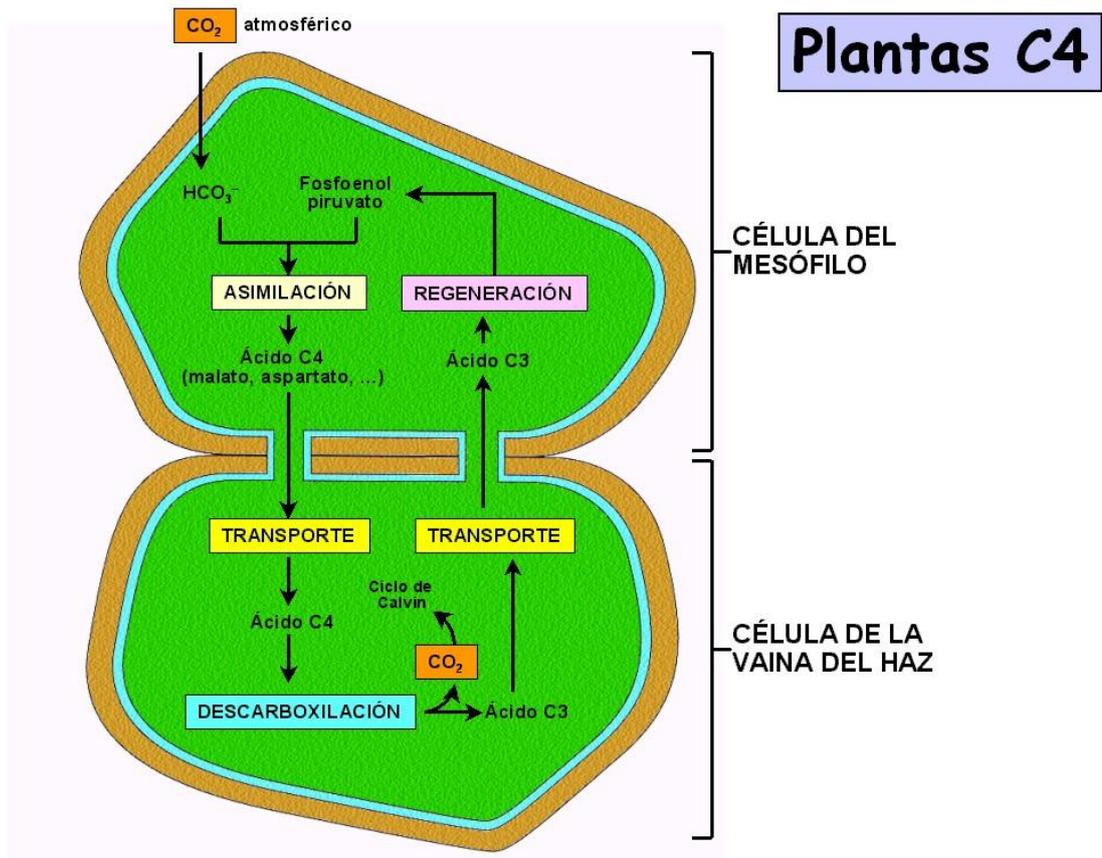


Figura 3-1. Vía de Hatch y Slack presente en las plantas C4.

Fuente: Universidad Politécnica de Valencia 2003

Alrededor del 0,4% de las 260.000 especies conocidas de plantas, son plantas C4. Pero ese pequeño porcentaje incluye los importantes cultivos alimenticios de maíz, sorgo, caña de azúcar y el mijo. También se incluyen la grama y la hierba bermuda. Muchos pastos tropicales y juncias son plantas C4. (Moore y Vodopich 1992)

1.8. Liofilización

Es un método de eliminación de agua de por congelación del producto húmedo a bajas temperaturas y en condiciones de vacío, en el que el disolvente solidificado pasa directamente a vapor, sin pasar por el estado líquido, evitando la fase líquida. (Navarro 1998)

Ventajas

- Se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.
- Se eliminan los fenómenos de oscilación.
- La gran porosidad del producto facilita con rapidez la reconstitución por la adición de agua o del solvente adecuado.
- Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo productos de larga estabilidad. (Navarro 1998)

Inconvenientes

- Equipos de alto costo
- Elevado gasto energético
- Mayor tiempo de operación

1.9. Chusquea

El género *Chusquea* consta de unas 150 especies distribuidas en América desde México a través de América Central, las Antillas, en los Andes hasta Chile y Argentina, Juan Fernández, este del Brasil y el macizo guayanés. En el Ecuador están representadas unas 25 especies; 7 se encuentran en los bosques andinos hasta los páramos: *Chusquea lehmannii* Pilger, *C. macclurei* L. G. Clark, *C. neurophylla* L. G. Clark, *C. perligulata* (Pilger) McClure, *C. scandens* Kunth, *C. serrulata* Pilger y *C. tessellata* Munro. (Ulloa Ulloa y Jorgensen 2011)

Tabla 3-1: Taxonomía *Chusquea*

TAXONOMÍA	
Familia:	<i>Poaceae</i>
Subfamilia:	<i>Bambusoideae</i>
Tribu:	<i>Bambuseae</i>
Subtribu:	<i>Chusqueinae</i>
Género:	<i>Chusquea</i>

Fuente: Ecured, 2012

Realizado por: Diego Proaño, 2017

La *Chusquea*, igual que otras especies de bambúes, sólo florecen una vez hacia el final de su vida y esto sólo sucede cada varias décadas. Toda la población de una región florece, fructifica y luego mueren todas las plantas. (Organización para la Educación y Protección Ambiental 2016)

El uso del género *Chusquea* se remonta a miles de años, por lo tanto, hoy en día son millones de personas las que ven en esta *gramínea* un recurso de incalculable valor, ya que se ha transformado en pilar fundamental de subsistencia. Los usos que se le pueden dar son variados. Por ejemplo, producción de papel, muebles y revestimientos interiores como parque para pisos. (Sotomayor 2013)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de recolección de la muestra

La materia vegetal está representada por la planta *Chusquea* que se recolectó en el bosque nativo San Lorenzo-Guaranda, en la Parroquia Llagos, Cantón Chunchi, Provincia Chimborazo, tramitándose el permiso de uso para su investigación a través del Ministerio del ambiente, siguiendo el procedimiento dado por el Ing. Miguel Acuña.

2.2. Lugar de investigación

La siguiente investigación es de clase experimental, la cual se realizó en el 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.

2.3. Descripción botánica

Obtenida la materia vegetal se realizó la identificación botánica y taxonómica, bajo la dirección del Ing. Jorge Caranqui, en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para lo cual se efectuó una comparación de semejanzas de varios aspectos de la planta en estudio, con respecto a las plantas patrones existentes en este departamento.

2.4. Control de calidad de la droga cruda

Para el control de calidad de la materia vegetal se siguió la siguiente metodología:

2.4.1. Determinación del Contenido de Humedad

La presencia de exceso de agua en las drogas vegetales, puede promover el crecimiento de hongos, insectos y la hidrólisis de constituyentes que pueden provocar el deterioro de la droga. Es por ello, que se realiza el método de determinación del contenido de humedad para comprobar si la materia vegetal se encuentra de los límites establecidos por la Farmacopea Española del 2002 que es de 8-14%.

Esta determinación es un método gravimétrico que se realiza por desecación, para lo cual se pesan 2 gramos del material vegetal triturado, transfiriéndose a una cápsula previamente tarada y 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 llevó a cabo por triplicado y posteriormente se realizaron los cálculos, por medio de la siguiente ecuación: (MINSAP 1992)

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

En el que:

M1: Representa la masa de la cápsula vacía.

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

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

100: Es un factor matemático para los cálculos

2.4.2. Determinación de Cenizas Totales

El método de cenizas totales está diseñado para medir la cantidad total de materia que queda después de la ignición. Este incluye tanto las cenizas fisiológicas, que proceden del tejido mismo de las plantas, como las cenizas no fisiológicas, que son el residuo de la materia externa adherida a la superficie de la planta.

Es un método gravimétrico y para esta determinación se procede a pesar 2 gramos del material vegetal triturado, para transferirlo a un crisol de porcelana anteriormente tarado el cual es colocado en un reverbero para carbonizar la muestra y posteriormente introducido 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 presenten trazas de carbón en el residuo se le añaden gotas de peróxido de hidrógeno o de ácido nítrico o de solución de nitrato de amonio 10 mg en 100 mL y se procede a evaporar con la finalidad de que el residuo sea de color blanco. Este ensayo se realizó por triplicado y posteriormente se efectuaron los cálculos correspondientes a través de la siguiente ecuación: (MINSAP 1992)

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.

2.4.3. Determinación de Cenizas Solubles en Agua

El método de cenizas solubles en agua es la diferencia en peso entre las cenizas totales y el residuo, después del tratamiento de las cenizas totales con agua, es decir, aquella parte de las cenizas totales que se disuelven en agua.

Es un ensayo gravimétrico en el que para su determinación se añadió 20 mL de agua destilada, luego se procede a tapan el crisol de porcelana y se hirvió suavemente 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 posteriormente se efectuaron los cálculos correspondientes a través de la siguiente ecuación: (MINSAP 1992)

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

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

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

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

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

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

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

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

H: Representa el porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.4.4. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

El método de cenizas insolubles en ácido es el residuo obtenido después de hervir las cenizas totales con ácido clorhídrico diluido y llevar a la ignición el material insoluble restante. Estas miden la cantidad de sílice presente, especialmente como arena y tierra silícea.

Es un método gravimétrico en el que para la determinación a las cenizas totales se le añade 20 mL de ácido clorhídrico al 10%, se procede a tapan el crisol de porcelana y se hierve 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 posteriormente se efectuaron los cálculos correspondientes a través de la siguiente ecuación: (MINSAP 1992)

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.

2.5. Tamizaje Fitoquímico

Para realizar la determinación fitoquímica de la materia vegetal se utilizó la extracción con solventes de diferente polaridad (éter etílico, etanol y agua) con la finalidad de lograr el mayor agotamiento de la sustancia y ensayar en cada extracto los metabolitos que de acuerdo a su solubilidad puedan ser extraídos en estos solventes. Se obtuvieron los extractos etéreo, etanólico y acuoso, en los cuales se realizó el análisis fisicoquímicos cualitativos de cada uno de ellos, mediante las siguientes reacciones de caracterización.(Martinez y Cuellar 2001)

Sudan para Aceites y grasas

Baljet: Lactonas y Cumarinas

Dragendorff, Mayer y Wagner para Alcaloides

Liebermann-Buchard para triterpenos y esteroides

Shinoda para Flavonoides

FeCl₃ para Fenoles y Taninos

Borntrager para Quinonas

Espuma para Saponinas

Fehling para azucares reductores

2.6. Obtención del extracto seco de *Chusquea sp.*

Para la obtención del extracto de *Chusquea sp*, se parte de 20 g de materia vegetal molido, se añade 10 mL de etanol al 70% y 10 mL de hexano se homogenizó en el vórtex. Se filtró mediante embudo büchner, se eliminó las clorofilas mediante extracción líquida con hexano realizando varias extracciones con 10 mL c/u en un embudo de separación. Se concentró en rotavapor (Büchi R 110), obteniendo el extracto acuoso.

Se realiza el liofilizado del extracto acuoso concentrado, obteniendo un polvo que representa a extracto seco, con el cual se ejecutan los ensayos de muerte celular inducida, FPS, cromatografía de capa fina, cantidad de flavonoides totales, barrido por espectrofotometría UV.

2.7. Preparación de los subextractos

50 mg del extracto seco de *Chusquea sp* se disuelven en 25 mL de etanol al 70%, obteniendo el subextracto de 2000 ppm; a partir de este se realizan diluciones para obtener los subextractos de 200 ppm y 20 ppm.

2.8. Estándar de Mcfarland

Para estandarizar el número aproximado de bacterias que se encuentran en una suspensión líquida, mediante su turbidez, se utiliza la escala Mcfarland, la cual es una solución líquida compuesta por cloruro de bario y ácido sulfúrico, al reaccionar se produce un precipitado de sulfato de bario. (Murray PR, Baron EJ 1999)

Tabla 1-2: Preparación de estándar McFarland

Preparación de estándar McFarland	
Producto Químico	Volumen
Ácido sulfúrico – 0,18 M	99,5 mL
Cloruro de Bario – 0,048 M	0,5 mL

Fuente: Murray, 1999

Se realizó una curva de calibración con el estándar McFarland 1-2-3-4. Se realiza el estándar de McFarland 0,5 el cual corresponde a una suspensión bacteriana de $1,5 \times 10^8$ células por mL. A la cual se midió su absorbancia para su respectivo control de calidad.

2.9. Efecto protector frente a la radiación UVB por muerte celular inducida

Una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) se cultivó en caldo cerebro corazón para su reactivación. El extracto alcohólico se disolvió en etanol a concentraciones de 2000 ppm, 200 ppm y 20 ppm. Se colocó en un tubo de cuarzo de 1cm de diámetro detrás del cual se ubicó otro tubo de cuarzo conteniendo una suspensión de bacterias de *Escherichia coli* (ATCC 25922) 0.5 McFarland. De tal forma que ambos tubos formaron una unidad experimental. (Avila Acevedo et al. 2005)

Las unidades experimentales fueron irradiados con una lámpara de UVB marca Philips, Broadband TL 40w/12 RS a una dosis de irradiación de 0,60 J / cm². Se detectó el número de unidades formadoras de colonias sobrevivientes a la radiación UVB sembrando 5 uL de la suspensión bacteriana en agar nutritivo cada 30 minutos por cuatro horas realizando diluciones con solución de cloruro de sodio 0.9 % . Se realizó el presente ensayo por triplicado para el extracto y controles a las concentraciones propuestas anteriormente. (Avila Acevedo et al. 2005)

2.10. Factor de protección solar

Para la determinación del FPS los extractos secos se diluyen en etanol 70%, luego se prepara una solución a 10 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 70% como blanco para esta determinación. (Violante et al. 2009)

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

$$SPF = CF \times \int_{290}^{320} EE_{\lambda} \times I_{\lambda} \times Abs(\lambda)$$

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 se muestra a continuación.

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 1-2: Valores de EE X I

Fuente: Sayre, 1979.

2.11. Cromatografía en capa fina

Se empleó placas de sílica gel 60 F254, la fase móvil a utilizar en la cromatografía en capa fina es la siguiente: ACETATO DE ETILO: ÁCIDO ACÉTICO: ÁCIDO FÓRMICO: AGUA (10:1.1:1.1:2.6), la mezcla se colocó en un embudo de separación hasta su saturación, la fase acuosa se descarta. En la cuba se coloca la fase móvil y la placa de sílica la cual tiene el extracto etanólico de *Chusquea sp* a una concentración de 2000 ppm, posteriormente se deja correr la fase, después se procede al secado y al revelado mediante solución alcohólica de $AlCl_3$ al 1% y PEG 400 como potenciador de fluorescencia, finalmente mediante la cámara de UV se observan las manchas presentes en la placa las cuales corresponden a compuestos propios del material vegetal.

2.12. Análisis total de flavonoides

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

- Se toma una alícuota (10 μ L) del extracto de *Chusquea sp* y se diluye en 10 mL de metanol.
- Tomar 1 mL de la solución metanólica, añadir 300 μ L de Nitrito de Sodio 5% y 4 mL de agua destilada, dejar en reposo 5 minutos.
- Posteriormente añadir 300 μ L de Cloruro de Aluminio, dejar en reposo 6 minutos, protegido de la luz y a temperatura ambiente.
- Finalizado el tiempo de reposo añadir 2 mL de Hidróxido de Sodio 1M, Dejar en reposo 5 minutos.

- e. Medir la absorbancia a una longitud de onda igual a 510 nm, frente a la absorbancia del blanco correspondiente. (Wu y Ng 2008)

El valor final de la absorbancia debe aproximarse a 0.06.

2.13. Barrido por Espectrofotometría UV

El barrido se lo realizo en el espectrofotómetro longitud de onda de 200 a 400 nm para determinar los máximos de absorción; se prepararon soluciones de 50 ppm del extracto etanólico de *Chusquea sp* y a los controles PAMIDATO Y OMC, utilizando solventes como Agua, Etanol 70% y Cloroformo, los cuales también tendrán la función de blancos al registrar las absorbancias, al final se compararon los picos obtenidos en cada solución.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Extracto seco

A partir de 20, 0113 gramos de hojas de *Chusquea sp* se obtuvo un peso de 2.8891 que corresponde al extracto seco liofilizado, obteniendo un rendimiento de 14, 44%

3.2. Control de calidad de la droga cruda

Tabla 1-3: Resultados contenido de humedad

DETERMINACIÓN REALIZADA	RESULTADO	Límite de Humedad Normativa Ecuatoriana de Fitoterápicos
Contenido de Humedad	8,88%	14%

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Determinación del contenido de humedad

Para la determinación del contenido de humedad se realizó mediante el método gravimétrico de secado en estufa de aire, dando como resultado 8,88% (Ver Tabla 1-3) de humedad presente en *Chusquea sp*, el cual se encuentra dentro de los valores establecidos por la Normativa Ecuatoriana de Fitoterápicos. Un valor de humedad superior al límite, causa factores negativos para la planta como una proliferación de hongos, insectos y la hidrólisis de sus constituyentes, causando su deterioro.

Tabla 2-3: Resultados del contenido de cenizas.

DETERMINACIÓN REALIZADA	RESULTADO Base hidratada	RESULTADO Base anhidra	Límites Aceptados Real Farmacopea Española 2002
Cenizas Totales	1,90%	2,09%	5%
Cenizas Solubles en Agua	0,67%	0,74%	2%
Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico	0,24%	0,26%	1%

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Determinación de Cenizas Totales

El resultado de la determinación de cenizas totales en base hidratada es 1,90% y en base anhidra 2,09%, estos datos se encuentran por debajo de los límites propuestos por la Farmacopea Española 2002.

Determinación de Cenizas Solubles en Agua

Para cenizas Solubles en agua el resultado en base hidratada es 0,67% y para base anhidra 0,74% , encontrándose dentro de los valores establecidos por la Farmacopea Española 2002.

Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico

Para cenizas insolubles en ácido clorhídrico el resultado en base hidratada es 0,24% y para base anhidra 0,26%, encontrándose por debajo de los límites establecidos por la Farmacopea Española 2002, lo que indica que *Chusquea sp* posee una menor cantidad de contaminación por sílice y productos térreos.

3.3. Tamizaje Fitoquímico

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

ENSAYO	RESULTADO
Sudan	Positivo (+++)
Dragendorft	Negativo
Mayer	Negativo
Wagner	Negativo
Baljet	Positivo
Lieberman-Buchard	Positivo (Cantidades Importantes)

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Tabla 4-3: Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico

ENSAYO	RESULTADO
Catequinas	Positivo
Resinas	Negativo
Fehling	Positivo
Espuma	Positivo (+)
Cloruro Férrico	Positivo (Taninos tipo pirocatecólicos)
Baljet	Positivo
Lieberman-Buchard	Positivo (Cantidades Importantes)
Borntrager	Positivo (Coloración amarilla)
Antocianidinas	Negativo
Dragendorft	Negativo
Mayer	Negativo
Wagner	Negativo
Shinoda	Positivo (+)

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Tabla 5-3: Resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico del extracto acuoso

ENSAYO	RESULTADO
Dragendorft	Negativo
Mayer	Negativo
Wagner	Negativo
Cloruro Férrico	Positivo (Taninos tipo pirocatecólicos)
Shinoda	Positivo (+)
Fehling	Positivo
Espuma	Positivo (+)

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Una vez realizado los ensayos correspondientes del tamizaje fitoquímico se toma como referencia el extracto etanólico de *Chusquea sp* el cual se va utilizar en la investigación, proyectando resultados como la ausencia de alcaloides, por el resultado negativo en las pruebas de Dragendorft, Mayer y Wagner, los metabolitos que se identifican con su presencia son catequinas, cumarinas, saponinas, esteroides por el resultado positivo en Liberman-Buchard, Taninos tipo pirocatecólicos y flavonoides, presencia en los ensayos de cloruro férrico y Shinoda respectivamente, estos últimos de gran importancia ya que son los que encargados de brindar protección contra la radiación UVB. Al comparar con especies vegetales de la familia Poaceae, *Chusquea* poseen metabolitos similares en especial los compuestos fenólicos.

3.4. Efecto protector frente a la radiación UVB por muerte celular inducida

El ensayo de muerte celular inducida se lo realizó exponiendo las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) a una lámpara de radiación UVB, bajo la protección del extracto etanólico de *Chusquea sp*, a concentraciones de 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm, formando la unidad de experimentación, se completaron 7 tiempos en el que su intervalo es de 30 minutos, alcanzando los siguientes resultados:

Tabla 6-3: UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de *Chusquea sp*, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.

Tiempo (h)	UFC 2000 ppm	UFC 200 ppm	UFC 20 ppm	UFC Blanco
0	149333333	132000000	125333333	134666667
0,5	15000000	4666667	1333333	0
1	933	267	0	0
1,5	267	0	0	0
2	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0
3	0	0	0	0

Realizado por: Diego Proaño, 2017

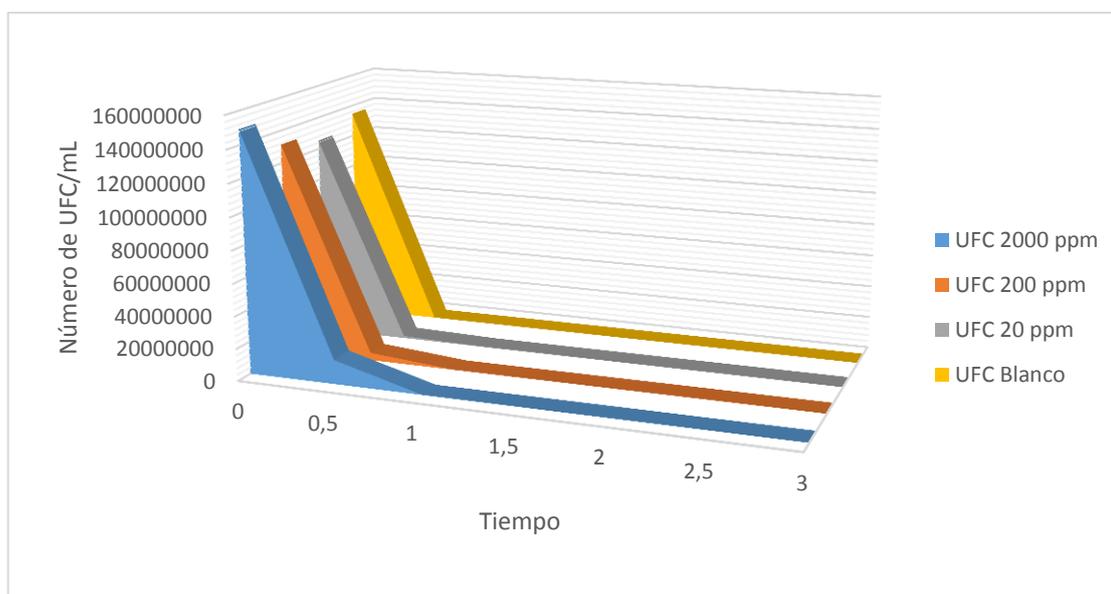


Gráfico 1-3 UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de *Chusquea sp*, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Para los controles utilizados en la investigación PAMIDATO y OMC, se procedió con la misma metodología, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 7-3: UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de PAMIDATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.

TIEMPO (h)	UFC 2000 ppm	UFC 200 ppm	UFC 20 ppm	UFC Blanco
0	128000000	118666667	130666667	118666667
0,5	12333333,3	3666666,67	1666666,67	0
1	600	266,666667	0	0
1,5	133,333333	0	0	0
2	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0
3	0	0	0	0

Realizado por: Diego Proaño, 2017

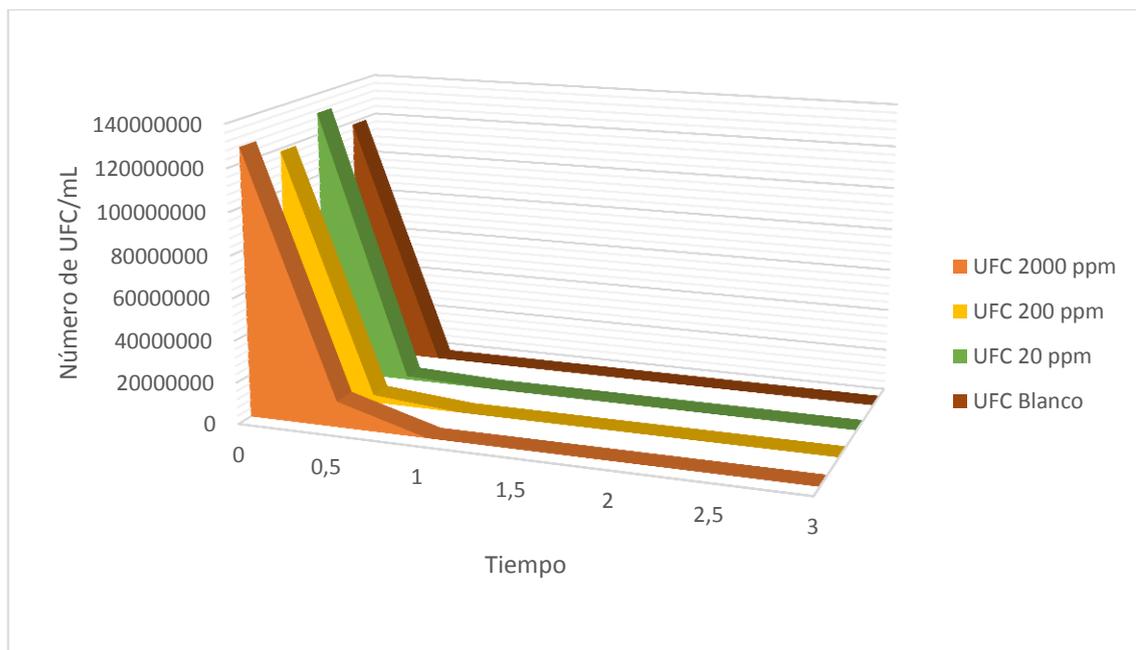


Gráfico 2-3 UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de PAMIDATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Tabla 8-3 UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de OCTILMETOXICINAMATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.

TIEMPO (h)	UFC 2000 ppm	UFC 200 ppm	UFC 20 ppm	UFC Blanco
0	158666667	148000000	138666667	118666667
1	13666666,7	4666666,67	1666666,67	0
2	1133,33333	333,333333	0	0
3	533,333333	0	0	0
4	133,333333	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0

Realizado por: Diego Proaño, 2017

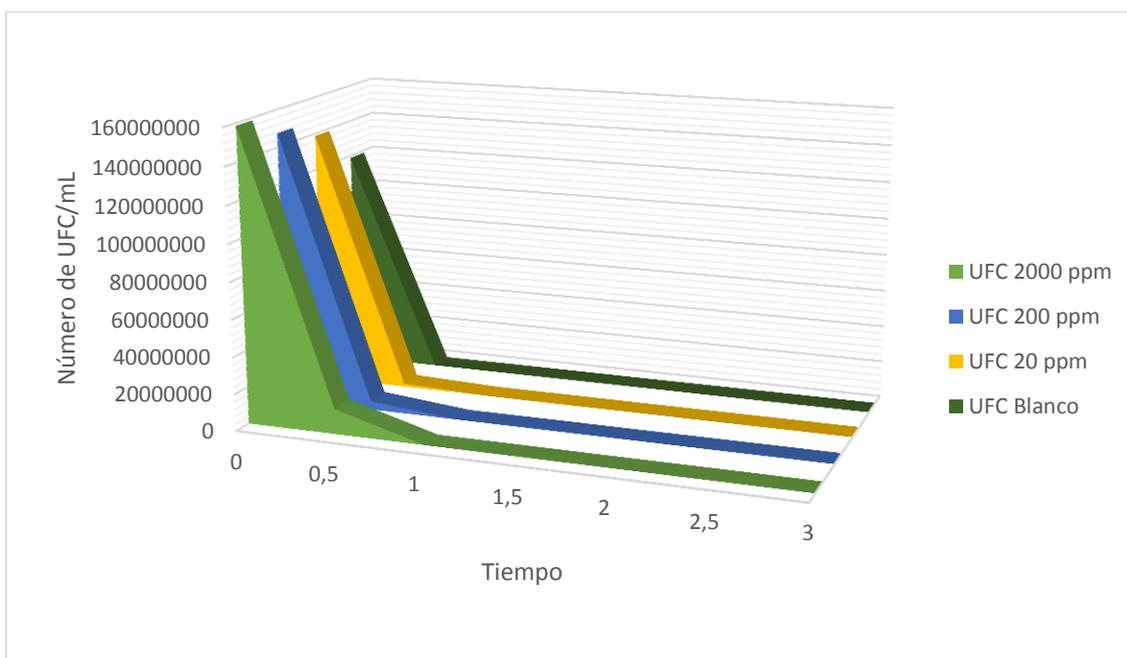


Gráfico 3-3 UFC sobrevivientes a la exposición de radiación UVB, extracto etanólico de OCTILMETOXICINAMATO, a concentraciones 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Al final se determina el porcentaje de tasa de viabilidad celular, para el extracto etanólico de *Chusquea sp*, y los controles PAMIDATO Y OMC, a sus diferentes concentraciones de 2000 ppm, 200 ppm, 20 ppm.

Tabla 9-3 Porcentaje de tasa de viabilidad celular total.

BLANCO	OMC 20 ppm	PAMIDATO 20 ppm	Chusquea 20 ppm	Chusquea 200 ppm	Chusquea 2000 ppm
0%	1,26%	1,06%	1,08%	3,58%	10,62%

Realizado por: Diego Proaño, 2017

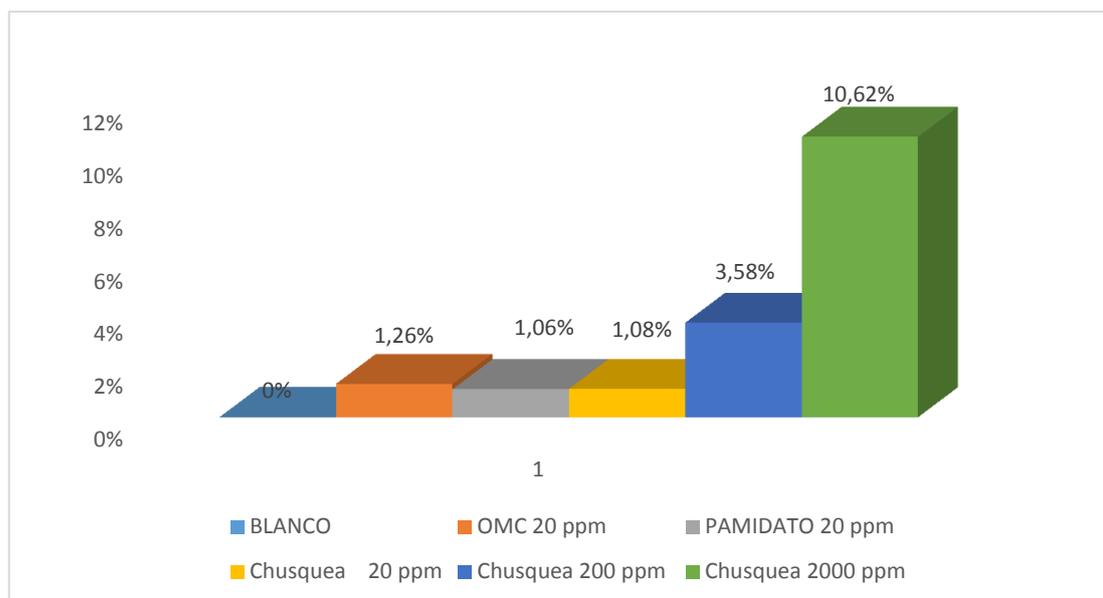


Gráfico 4-3 Porcentaje de tasa de viabilidad celular total.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Extracto etanólico de Chusquea sp 20 ppm

El extracto etanólico de *Chusquea sp* presenta un valor de tasa de viabilidad celular de 1.08%, este porcentaje posee una semejanza con los controles utilizados en la investigación, PAMIDATO 1,06 Y OMC 1,26; al realizar el análisis estadístico y mediante la comparación múltiple de estos factores, se comprueba que no existe una diferencia estadísticamente significativa, los 3 extractos poseen una actividad fotoprotectora comparable a esta concentración.

Extracto etanólico de Chusquea sp 200 ppm

El extracto etanólico de *Chusquea sp* a 200 ppm presenta una tasa de viabilidad celular de 3,58%, al realizar el análisis estadístico y mediante la comparación múltiple de estos factores, se comprueba que no existe una diferencia estadísticamente significativa con los controles

PAMIDATO y OMC, teniendo una propiedad fotoprotectora comparable, tomando en cuenta que los controles se encuentran a una concentración de 20 ppm.

Extracto etanólico de Chusquea sp 2000 ppm

El extracto etanólico de *Chusquea sp* a 2000 ppm presenta una tasa de viabilidad celular de 10,62%, al realizar el análisis estadístico y mediante la comparación múltiple de estos factores, se comprueba que existe una diferencia significativa con los controles utilizados en la investigación PAMIDATO y OMC (20 ppm), presentando una alta actividad fotoprotectora a esta concentración.

A continuación se muestran las gráficas del efecto protector del extracto etanólico de *Chusquea sp* a 20 ppm y de los controles utilizados, comparando las UFC de *Escherichia coli* sometidas a varios tiempos de exposición a la radiación UVB.

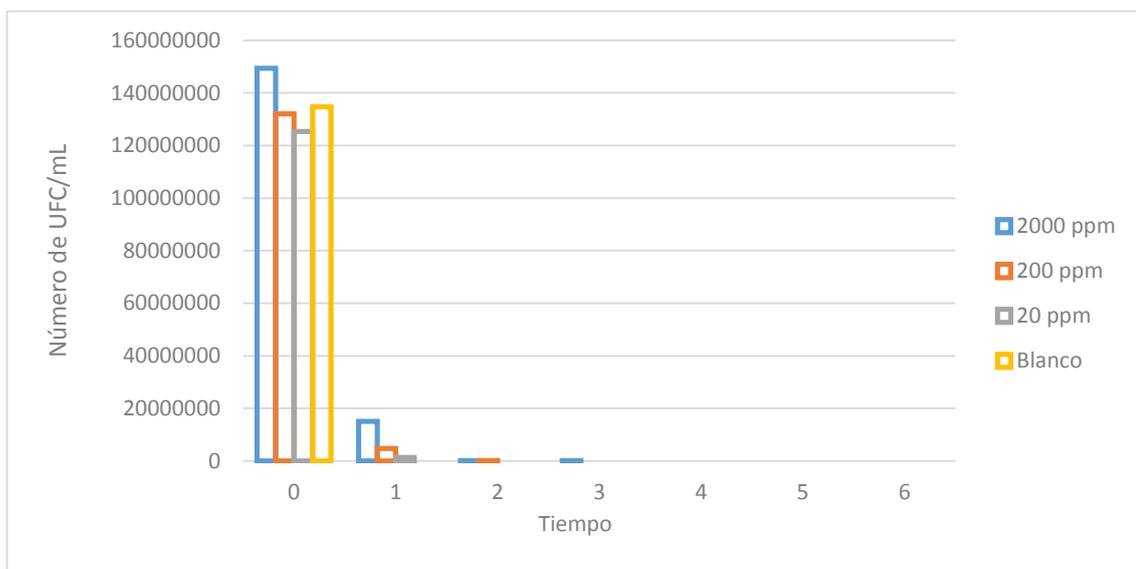


Gráfico 5-3 UFC sobrevivientes bajo la protección de *Chusquea sp* vs tiempo de exposición a radiación UVB.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

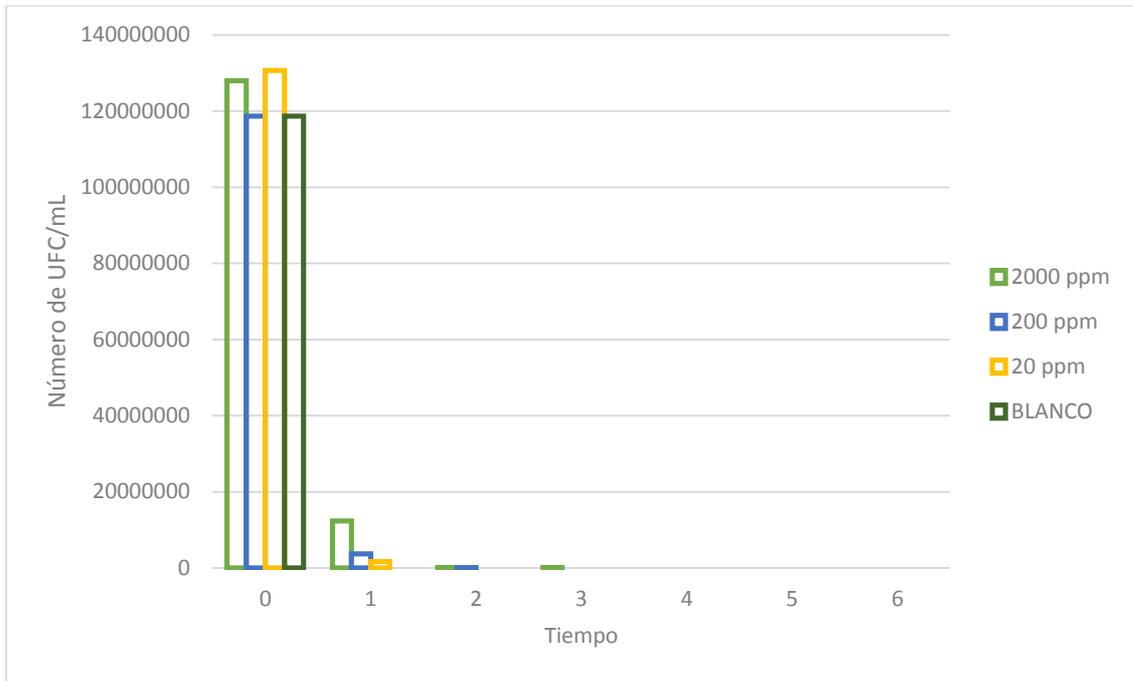


Gráfico 6-3 UFC sobrevivientes bajo la protección de Pamidato vs tiempo de exposición a radiación UVB.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

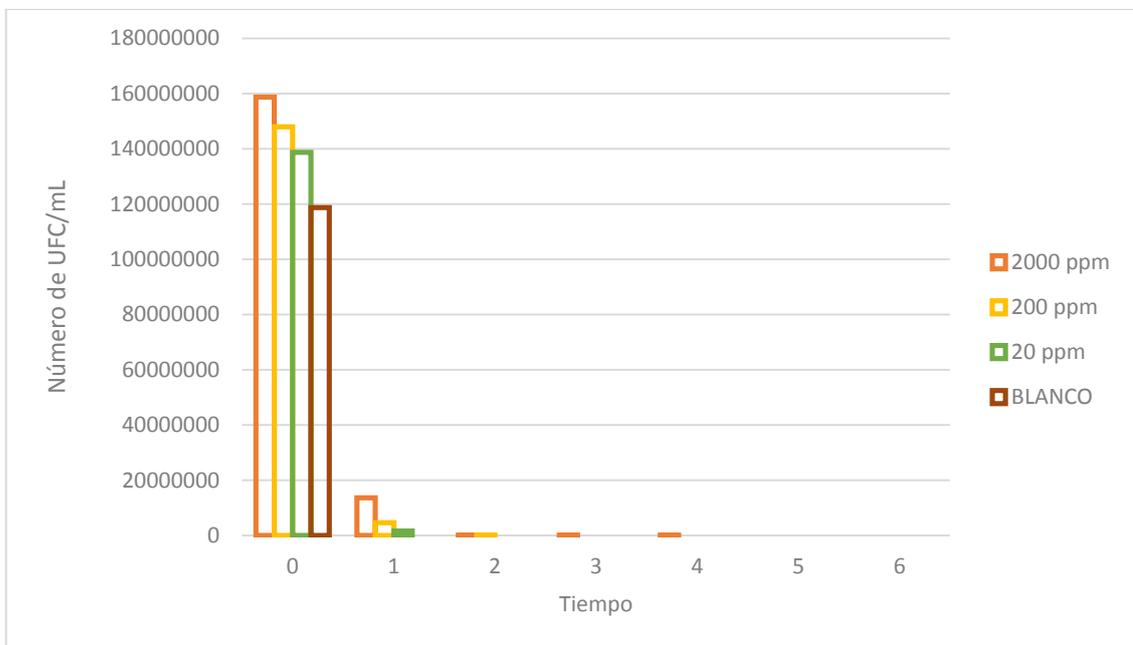


Gráfico 7-3 UFC sobrevivientes bajo la protección de Octilmetoxicinamato vs tiempo de exposición a radiación UVB.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

En el análisis de las gráficas se verifica un mayor efecto protector del extracto de *Chusquea sp* a una concentración de 2000 ppm, en comparación al de 200 ppm y 20 ppm, teniendo una supervivencia de UFC hasta el tiempo 3 (1,5 h) tras la exposición a radiación UVB, al igual que el control PAMIDATO teniendo valores muy parecidos en sus gráficas, conllevan a que poseen un efecto protector similar, pero no superior o igual al control OMC ya que este tiene una supervivencia hasta el tiempo 4 (2 h) tras su exposición.

3.5. Factor de protección solar

Se determina el factor de protección solar mediante la ecuación de Mansur, primeramente obteniendo las absorbancias del extracto etanólico de *Chusquea sp*, los controles PAMIDATO y OMC, a una concentración de 10 ppm, ya que a una concentración mayor el equipo se saturaba y mostraba valores constantes, a continuación se muestra como se calcula el factor de protección para cada extracto.

Tabla 10-3: Determinación del FPS de *Chusquea sp*

λ	Abs	Eext	FPS
290	0,286	0,0150	0,042
295	0,393	0,0817	0,321
300	0,503	0,2874	1,445
305	0,677	0,3278	2,219
310	0,737	0,1864	1,373
315	0,708	0,0839	0,594
320	0,655	0,0180	0,117
			6,11

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Tabla 11-3: Determinación del FPS de Pamidato.

λ	Abs	Eext	FPS
290	0,303	0,0150	0,045
295	0,411	0,0817	0,336
300	0,521	0,2874	1,497
305	0,625	0,3278	2,049
310	0,717	0,1864	1,336
315	0,768	0,0839	0,644
320	0,739	0,0180	0,133
			6,041

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Tabla 12-3: Determinación del FPS de Octilmetoxicinamato.

λ	Abs	Eext	FPS
290	0,868	0,0150	0,130
295	1,019	0,0817	0,833
300	1,124	0,2874	3,230
305	1,183	0,3278	3,878
310	1,262	0,1864	2,352
315	1,273	0,0839	1,068
320	1,168	0,0180	0,210
			11,702

Realizado por: Diego Proaño, 2017

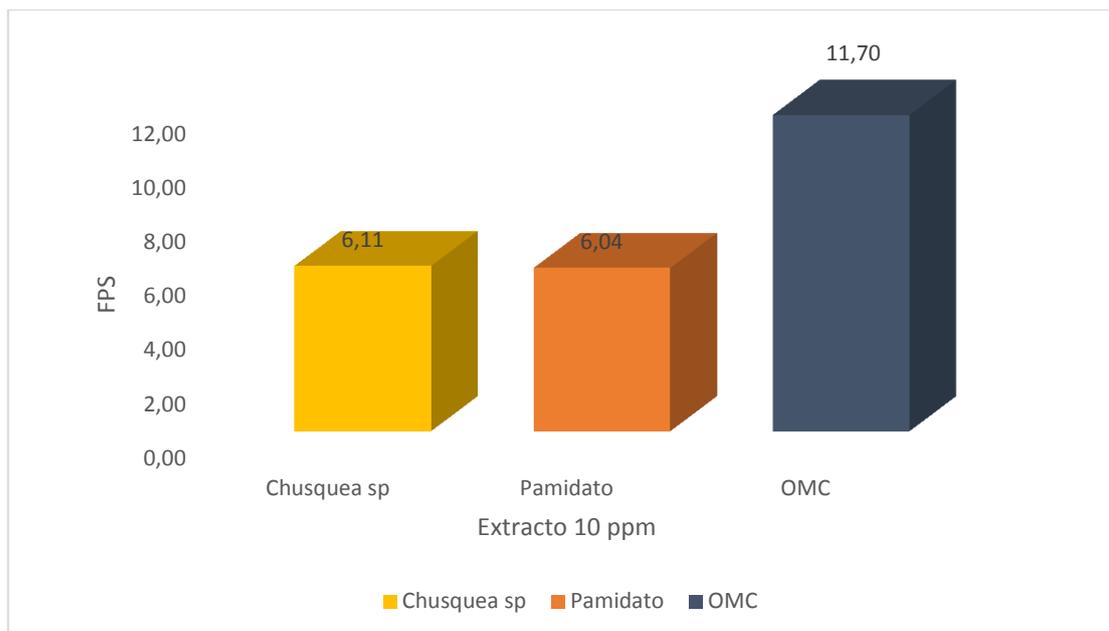


Gráfico 8-3 Comparación FPS determinados por la Ecuación de Mansur.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Se compara los valores obtenidos de FPS *Chusquea sp* 6,11 y el control PAMIDATO 6,94 teniendo una similitud en esta determinación, tomando en cuenta el ensayo de muerte celular inducida, se presentan resultados iguales por lo que poseen un efecto protector similar, al comparar con la nomenclatura propuesta por COLIPA sobre los índices de Factor de protección solar se encuentran en el nivel bajo de protección, en cambio el control OMC posee un valor mayor 11,07 y con lo que se puede clasificar a un nivel medio de protección, todo esto realizado a una concentración de 10 ppm.

3.6. Cromatografía de capa fina

Para la identificación de flavonoides exclusivamente glucósidos de flavona, flavonol y de tipo flavonona (Serie A), y varios O – glucósidos de quercetina y kaempferol (Serie B), se realizó la cromatografía de capa fina utilizando de fase móvil el siguiente sistema de solventes acetato de etilo -ácido fórmico - ácido acético glacial - agua (100:11:11:26).

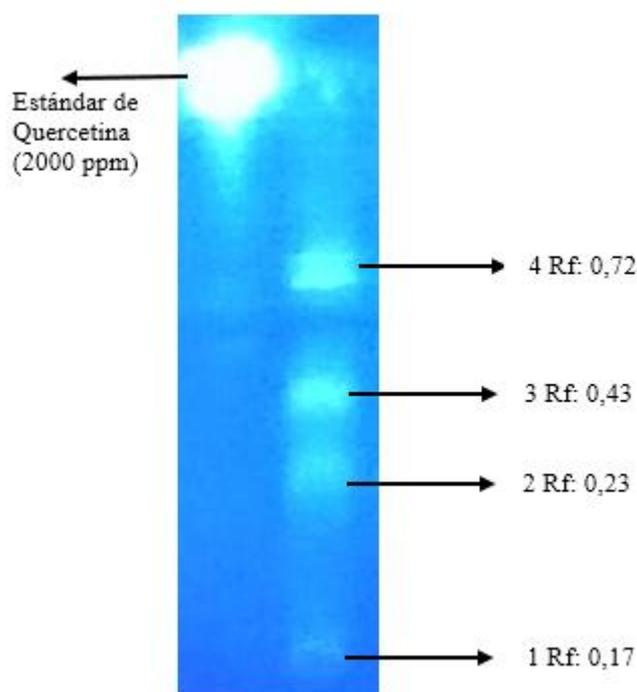


Figura 1-3 Placa Cromatográfica del extracto etanólico *Chusquea sp.*

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Después de seguir la metodología propuesta para cromatografía de capa fina, se logró identificar 4 Rf los cuales son comparados con compuestos de referencia como indica la siguiente tabla.

Tabla 13-3: Comparación de los resultados de la cromatografía con los compuestos de referencia.

Seria A		Serie B		<i>Chusquea sp</i>		
Rf	Compuesto	Rf	Compuesto	Rf	Compuesto	Posible Compuesto
-	-	.	-	0,17	1	-
-	-	0,23	Quercetin-3-O-gentiobioside	0,23	2	Quercetin-3-O-gentiobioside
-	-	0,43	Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside	0,43	3	Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside
0,72	Isorhamnetin-3-O-glucoside	-	-	0,72	4	Isorhamnetin-3-O-glucoside

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Realizada la comparación de los compuestos identificados de la placa cromatográfica de *Chusquea sp* con los de referencia, mediante los Rf, se han identificado 3 posibles compuestos:

- Quercetin-3-O-gentiobioside
- Kaempferol-3-O-rhamnoglucoside
- Isorhamnetin-3-O-glucoside

Los compuestos identificados servirán como base para futuros estudios sobre esta especie, ya que no se han reportados investigaciones similares sobre los metabolitos identificados en su composición química.

3.7. Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales de *Chusquea sp* primeramente se parte realizando una curva de calibración quercetina, mediante la cual se obtuvo la siguiente ecuación de la recta $y = 0.0011x + 0.0015$, con un coeficiente de correlación de 0.995. Se prosigue con la metodología propuesta, ejecutando el ensayo por triplicado, a continuación se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 14-3: Cuantificación de Flavonoides Totales del extracto etanólico de *Chusquea sp* expresados en porcentaje de equivalentes de quercetina por miligramo.

Ensayo de Cuantificación de flavonoides totales	%FTEQ
1	25,7660
2	23,2107
3	24,4883

Realizado por: Diego Proaño, 2017

Realizado las 3 repeticiones del ensayo se obtiene un promedio de 24,49% de flavonoides totales, el cual se lo expresa como quercetina presente en el extracto liofilizado, esta cantidad obtenida se encuentra dentro de un nivel medio, en comparación a otras especies de plantas que poseen mayor cantidad de flavonoides y a su vez mayor efecto fotoprotector.

3.8. Barrido por Espectrofotometría UV

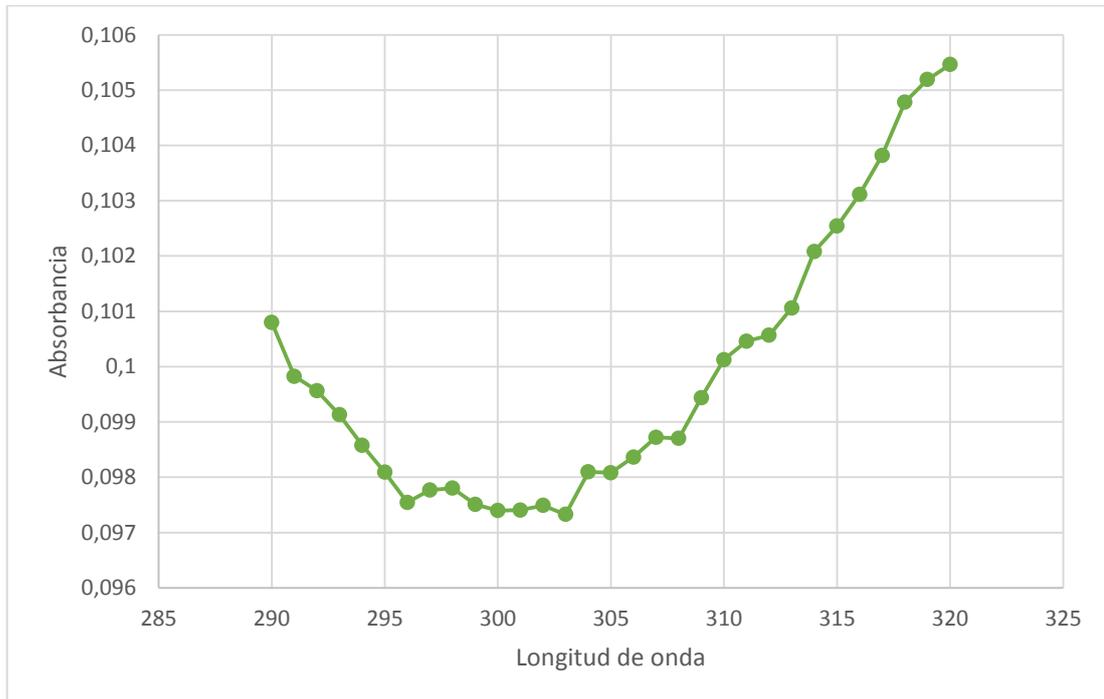


Gráfico 9-3 Espectro de solución acuosa de *Chusquea sp.*

Realizado por: Diego Proaño, 2017

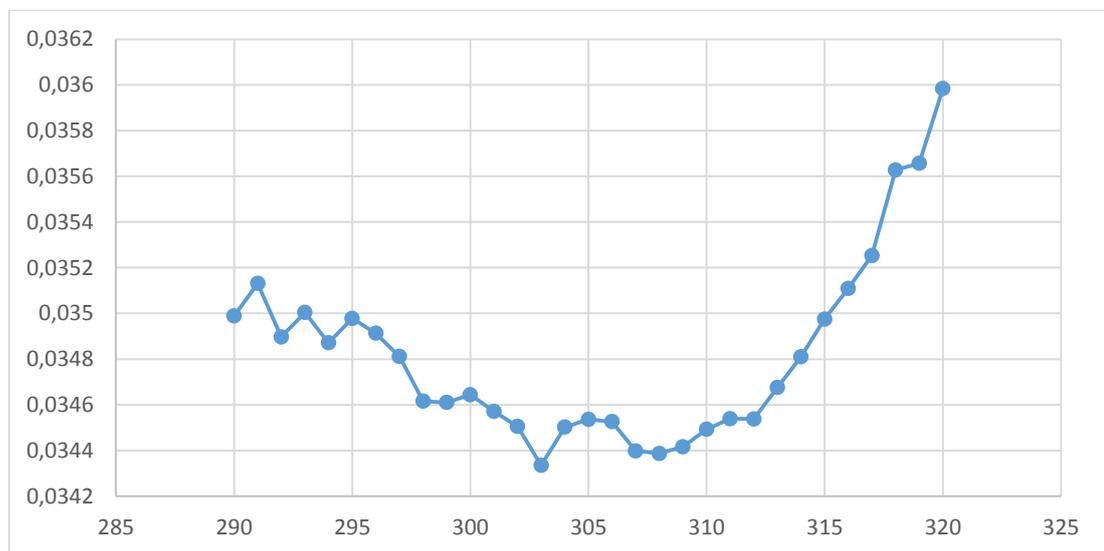


Gráfico 10-3 Espectro de solución alcohólica de *Chusquea sp.*

Realizado por: Diego Proaño, 2017

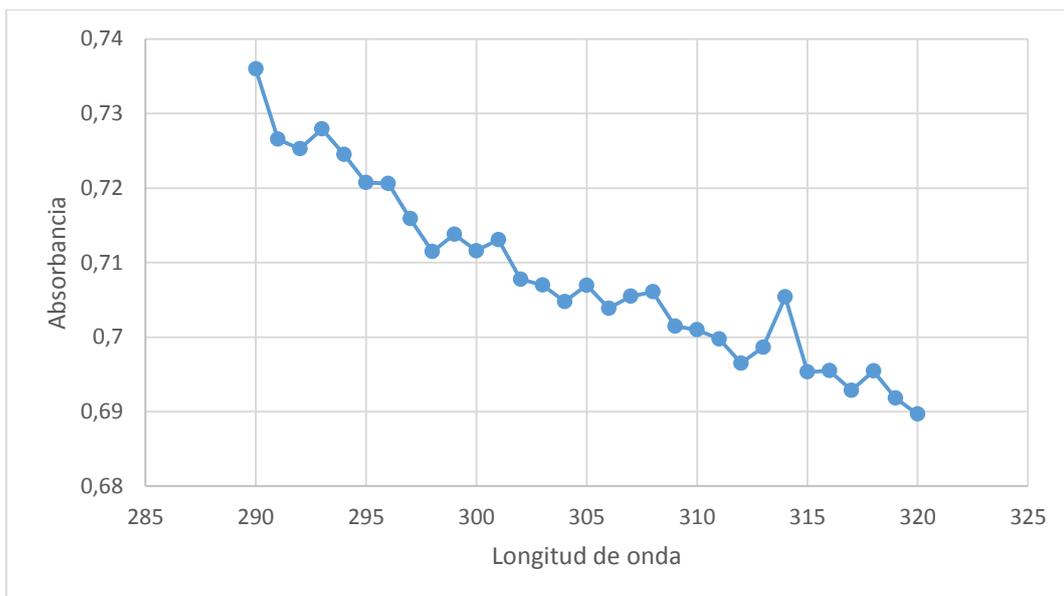


Gráfico 11-3 Espectro de solución clorofórmica de *Chusquea sp.*

Realizado por: Diego Proaño, 2017

De acuerdo trabajo de investigación “Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC”, dependiendo de la naturaleza del núcleo flavónico se identifican los niveles máximos de absorción los cuales se designan como banda I (longitud de onda entre 300 y 380 nm) que se encuentra asociada con la absorción causada por el anillo B o sistema cinamoil y la banda II (longitud de onda entre 240 y 280 nm) para el anillo A o denominada sistema benzoil. (Varas 2004)

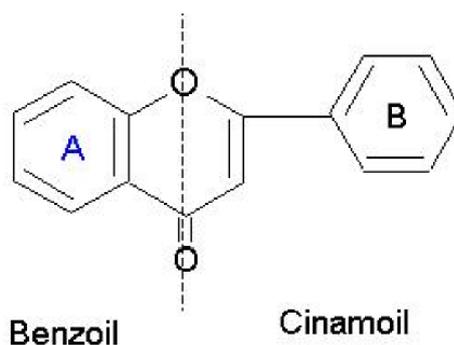


Figura 2-3 Esqueleto de flavonoide presentado por el sistema cinamoil y benzoil

Fuente: VARAS, D. 2004.

Las posiciones de estas bandas permiten diferenciar los tipos de flavonoides, como por ejemplo las flavonas y flavonoles con el grupo OH presentes en anillo A, pero no en anillo B, tienden a

dar un espectro marcado en Banda II y en Banda I débil, y a su vez moléculas que poseen grupos OH en el anillo B, su espectro es más pronunciado en la Banda I. (Varas 2004)

Existen casos particulares en los tipos de flavonoides como los que se absorben en los dos tipos de bandas en este caso las isoflavonas y dihidroflavonoides (ver gráfico 3-3), otros sufren un desplazamiento a longitudes de onda más cortas como los flavonoles 3-sustituídos.

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

Figura 3-3 Valores de absorción de los diferentes tipos de flavonoides en Bandas BI y BII

Fuente: LOCK, 1997

La especie vegetal *Chusquea sp* presenta picos de absorción en rangos 230 a 270 nm y de 300-330 nm, con lo que se puede encontrar compuestos como isoflavonas y dihidroflavonoides.

Del extracto clorofórmico no se pudo identificar picos de absorción, debido a que esta sustancia química no es adecuada para extraer una mayor cantidad de flavonoides.

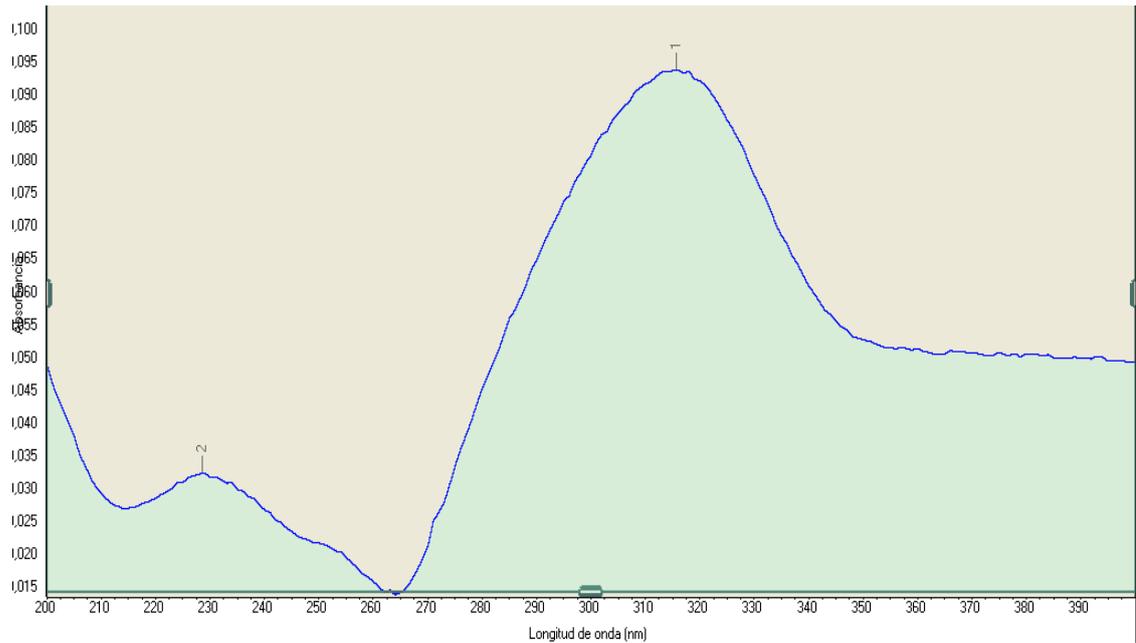


Figura 4-3 Espectro de solución acuosa de Pamidato.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

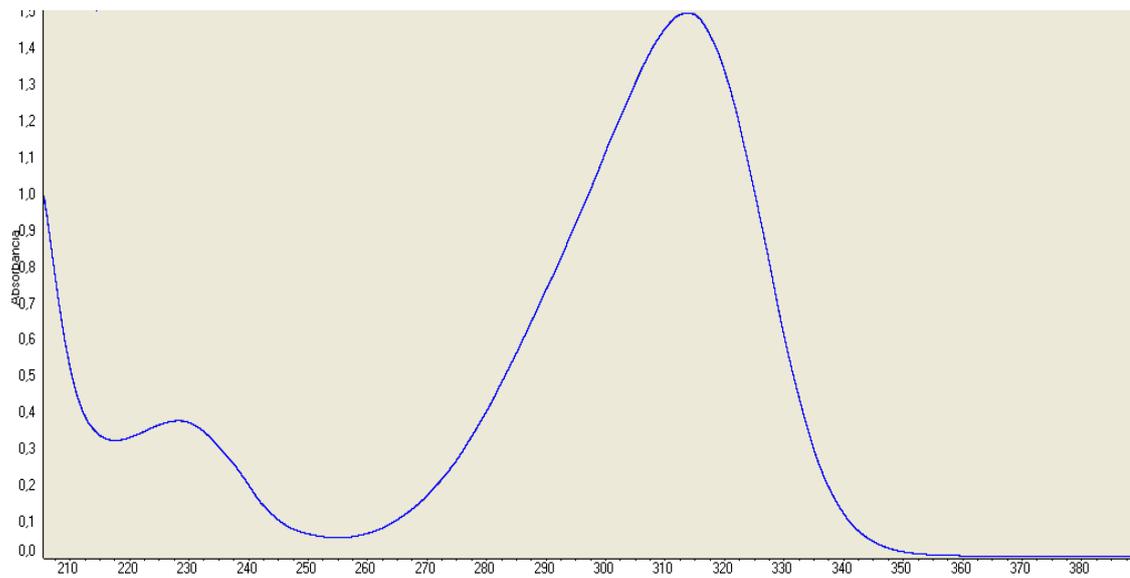


Figura 5-3 Espectro de solución etanólica de Pamidato.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

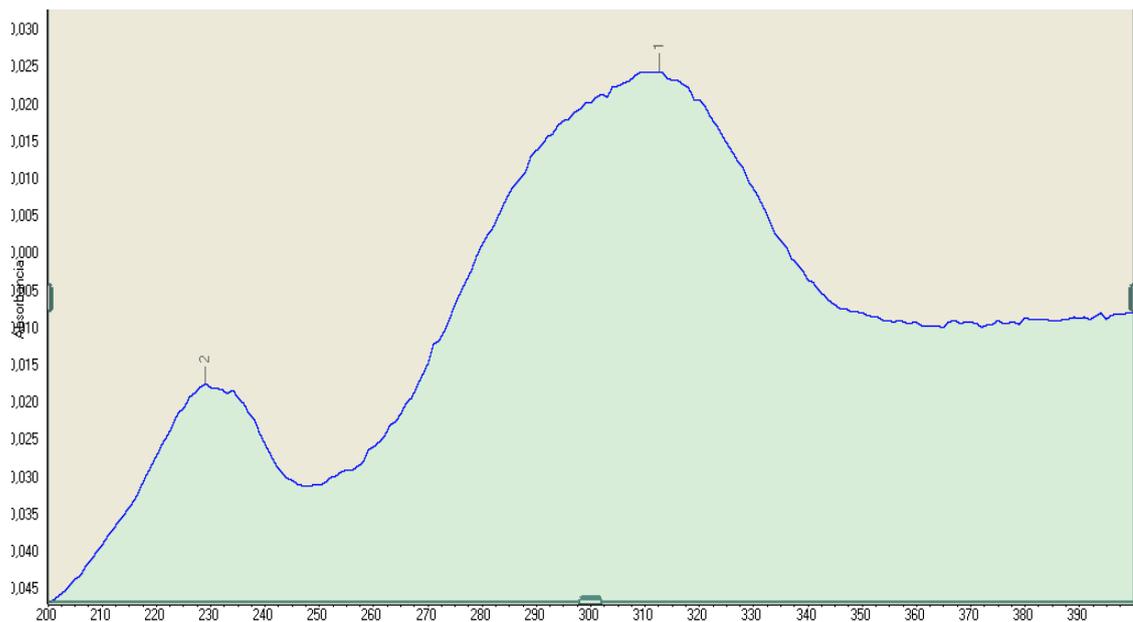


Figura 6-3 Espectro de solución acuosa de octilmetoxicinamato.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

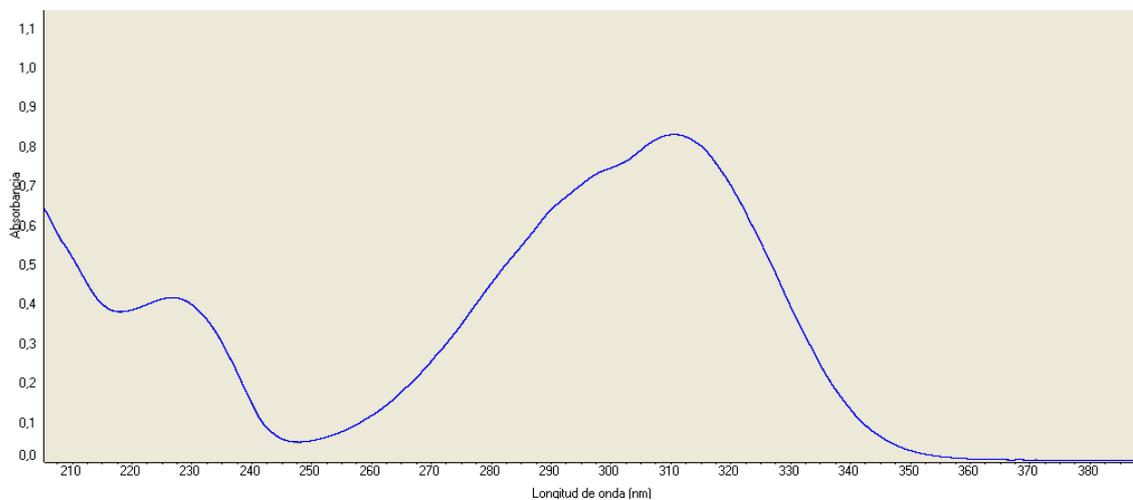


Figura 7-3 Espectro de solución etanólica de Octilmetoxicinamato.

Realizado por: Diego Proaño, 2017

En el barrido espectrofotométrico del extracto acuoso de los controles PAMIDATO y OMC se distinguen 2 picos principales a longitudes de ondas de 230 nm y 320 nm, igualmente en el extracto etanólico se distinguen estos picos a similares rangos, los cuales al comparar con los valores de absorción de los diferentes tipos de flavonoides pueden ser posibles compuestos como isoflavonas y dihidroflavonoides, que al comparar con los datos de Chusquea tienen coincidencia comprobando su propiedad como filtro UVB mediante el análisis realizado.

CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad fotoprotectora in vitro de los extractos etanólicos de *Chusquea sp*, obteniendo a una concentración de 2000 ppm el extracto que posee una mayor capacidad fotoprotectora de la especie vegetal, teniendo una tasa de viabilidad de supervivencia de UFC de 10,62%, que al ser comparada con los controles presenta similitud con PAMIDATO y una diferencia con OMC, comprobando su propiedad como filtro UVB.
2. Se obtuvo el factor de protección solar para el extracto etanólico de *Chusquea sp* a 10 ppm, mediante la ecuación de Mansur, obteniendo un resultado de 6,11 lo cual se lo clasifica en nivel bajo de protección, sin embargo a una mayor concentración este valor aumenta con lo que se podría clasificar a un mayor nivel de filtro UV.
3. Mediante el proceso cromatográfico se estableció 3 posibles compuestos presentes en *Chusquea sp*, quercetina-3-O-gentiobiosido, Kaempferol -3-O-ramnoglucósido, Isorhamnetin -3-O-glucósido, presuntamente responsables de la actividad fotoprotectora del extracto analizado.
4. El valor obtenido de flavonoides totales es 24,49%, un resultado que comprueba un nivel de protección media, al comparar con otras especies estudiadas. Al ser una planta C4 se esperaba una mayor efecto protector al crecer en diferentes ecosistemas, lo que hace pensar que esta especie vegetal posee varios mecanismos de defensa contra los daños nocivos de la radiación UV.

RECOMENDACIONES

1. Contactar con un herbario que tenga conocimiento sobre esta especie vegetal, para poder identificar que especie se analiza, ya que debido a sus condiciones propias de *Chusquea* resulto una dificultad su comparación con plantas patrones existentes.
2. Estandarizar la metodología ocupada en esta investigación e igualmente tener un espacio adecuado en el laboratorio para los equipos utilizados, así se lograrán resultados óptimos.
3. Se deberían realizar más investigaciones sobre esta especie vegetal ya que cuentan con compuestos de interés para otras determinaciones en el área de productos naturales.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ÁLVAREZ, E.S.D., et. al** "Estudios para el aprovechamiento potencial de hojas de guadua angustifolia kunth (poaceae), para el sector cosmético". *Revista Cubana de Farmacia* [en línea], 2015, (Cuba) 49(3), pp. 535-542. [Consulta: 09 octubre 2016].ISSN 15612988. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000300013
2. **AVILA ACEVEDO, J.G., et. al** "Photoprotective activity of Buddleja scordioides". *Fitoterapia* [en línea], 2015, (México) 76(3-4), pp. 301-309. [Consulta: 09 octubre 2016]ISSN 0367326X. DOI 10.1016/j.fitote.2005.03.009. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X05000535>
3. **BERNABÉU, A.** "La necesaria fotoprotección". *Offarm* [en línea], 2007, 26, pp. 51-56. [Consulta: 24 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/pt-revista-offarm-4-articulo-la-necesaria-fotoproteccion-13102414>.
4. **CAMPBELL, N. y REECE, J.** *Biología*. 7ª ed. Madrid- España: Gestora de derechos culturales. 2007, pp. 196-197.
5. **CAPOTE, A., LÒPEZ, Y. y TANIA, B.** *Agentes Físicos*. La Habana-Cuba: Ciencias Médicas. 2009, pp. 161-162.
6. **CASTILLO, A.** *Factores culturales que inciden en la presencia de cáncer de piel en pacientes de Solca y del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social de la ciudad de Ibarra en el periodo enero a julio del 2012* [En línea] (Tesis). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. 2012. pp. 3-10. [Consulta: 24 noviembre 2016]. Disponible en: http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1994/2/FSC_534_TESIS.pdf.
7. **CASTRO, J.G.** "Fotoprotección". *JANO* [en línea], 2003, LIX(404), pp. 404-409. [Consulta: 14 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/65/1484/30/1v65n1484a13049490pdf001.pdf>
8. **DALL'ACQUA, S., et. al** "The photodegradation of quercetin: Relation to oxidation". *Molecules* [en línea], 2012, (Italia) 17(8), pp. 8898-8907. ISSN 14203049. DOI

- 10.3390/molecules17088898. [Consulta: 14 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/8/8898/>.
9. **DE GÁLVEZ, M. V.** "Antioxidantes en fotoprotección, realmente funcionan?. *Actas Dermo-Sifiliograficas* [en línea], 2010, (España) 101(3), pp. 197-200. ISSN 00017310. DOI 10.1016/j.ad.2009.11.003. [Consulta: 14 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/antioxidantes-fotoproteccion-realmente-funcionan/articulo/S0001731010000888/>
 10. **DOMINGUEZ, A.** *Métodos en la investigación fotoquímica*. Mexico: Limusa. 1979. pp. 59.
 11. **EL COMERCIO.** *Alerta sobre aumentos de cáncer de piel por pérdida de capa de ozono* [en línea]. Ecuador: 2009. [Consulta: 14 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.eluniverso.com/2009/09/09/1/1430/alerta-sobre-aumentos-cancer-piel-perdida-capa-ozono.html>.
 12. **ELMETS, C.A., et.al** "Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols". *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 44, n° 3 (2001), (Estados Unidos) pp. 425-432.
 13. **EPSTEIN, J. y WANG, S.** *UVA Y UVB* [en línea]. Estados Unidos: SkinCancer, 2013. [Consulta: 16 octubre 2016]. Disponible en: [SkinCancer.org](http://www.skincancer.org/prevention/uva-and-uvb) <http://www.skincancer.org/prevention/uva-and-uvb>.
 14. **FERREIRA CESTARI, T., et. al.** "Considerations on photoprotection and skin disorders". *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie* [en línea], 2012, 139, pp. S135-S143. ISSN 01519638. DOI 10.1016/S0151-9638(12)70125-4. [Consulta: 19 octubre 2016] Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0151963812701254>.
 15. **GILABERTE, Y., et. al.** "Fotoprotección". *Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2003, 94(5), pp. 271-293. ISSN 00017310. DOI 10.1016/S0001-7310(03)76688-5. [Consulta: 19 octubre 2016] Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001731003766885>.
 16. **GILABERTE, Y. y GONZÁLEZ, S.** "Novedades en fotoprotección". *Actas Dermo-Sifiliograficas* [en línea], 2010, (España) 101(8), pp. 659-672. ISSN 00017310. DOI

10.1016/j.ad.2010.04.003. [Consulta: 19 octubre 2016] Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001731010002760>

17. **LOCK, O.** *Investigación Fitoquímica*. Segunda. Peru: Fondo. 1994. pp. 286.
18. **MARTINEZ, M. y CUELLAR, A.** *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana-Cuba: Félix Varela. 2001. pp. 291-292
19. **MATSUMURA, Y. y ANANTHASWAMY, H.N.** "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin". *Toxicology and Applied Pharmacology* [en línea], 2004, (Estados Unidos) 195(3), pp. 298-308. ISSN 0041008X. DOI 10.1016/j.taap.2003.08.019. [Consulta: 19 octubre 2016] Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X03004952>
20. **MEJÍA-GIRALDO, J.C., ATEHORTÚA, L. y PUERTAS-MEJÍA, M.Á.** "Fotoprotección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares". *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* [en línea], 2014, Colombia 12(52), pp. 272-281. [Consulta: 20 octubre 2016] Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm144i.pdf>
21. **MINISTERIO DE SALÚD PÚBLICA. ECUADOR.** *El 30 a 40% de casos de cáncer podrían evitarse si se cambian cinco malos hábitos*. [en línea]. Ecuador: 2013. [Consulta: 20 octubre 2016] 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>.
22. **MINSAP. CUBA.** *Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 309, «Droga Cruda. Métodos de ensayos»*. La Habana-Cuba. 1992. pp. 1-10.
23. **MOORE, R. y VODOPICH, D.** *Botany*. Segunda. Dubuque: WCB/McGraw-Hill. 1992
24. **MUJWAH, A.A., et. al.** "First isolation of a flavonoid from Juniperus procera using ethyl acetate extract". *Arabian Journal of Chemistry* [en línea], 2010, Arabia Saudita 3(2), pp. 85-88. ISSN 18785352. DOI 10.1016/j.arabjc.2010.02.003. [Consulta: 23 octubre 2016] Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.02.003>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210000146>

25. **MURRAY PR, BARON EJ, P.M.** *McFARLAND STANDARD. DALYNN biological* [en línea], 1999, [Consulta: 23 octubre 2016] Disponible en: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf.
26. **NAVARRO, M.** *La Liofilización de Productos Farmacéuticos*. [en línea]. 1998 [Consulta: 25 octubre 2016] Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/sint/vol4_1_98/sint5198.htm.
27. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** *Indice UV Solar Mundial*. 2003 [en línea]. [Consulta: 25 octubre 2016] Disponible en: <http://www.who.int/uv/publications/en/uvispa.pdf>.
28. **ORGANIZACIÓN PARA LA EDUCACIÓN Y PROTECCIÓN AMBIENTAL.** *Chusques*. 2016 [en línea]. [Consulta: 25 octubre 2016] Disponible en: http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=293&Itemid=30.
29. **PORTERO, S.** *Radiación Ultravioleta*. [en línea]. 2008 [Consulta: 25 octubre 2016] Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-fis/ultravioleta-morrillo.pdf>.
30. **SALAZAR, C.H.** "La radiación ultravioleta y el índice de radiación ultravioleta (IUV)". *Journal of Chemical Information and Modeling* [en línea], 2013, 53, ISSN 25246403 [Consulta: 20 octubre 2016] Disponible en: <http://docplayer.es/2033344-La-radiacion-ultravioleta-y-el-indice-de-radiacion-ultravioleta-iuv.html>
31. **SANCHEZ-MOREIRAS, a. M., et. al.** "Allelopathic Evidence in the Poaceae". *The Botanical Review* [en línea], 2004, 69(3), pp. 300-319. ISSN 0006-8101. DOI 10.1663/0006-8101(2003)069[0300:AEITP]2.0.CO;2. [Consulta: 20 octubre 2016] Disponible en: [http://link.springer.com/article/10.1663/0006-8101\(2003\)069\[0300:AEITP\]2.0.CO;2](http://link.springer.com/article/10.1663/0006-8101(2003)069[0300:AEITP]2.0.CO;2)
32. **SOLCA.** Tasas Estandarizadas, los 10 tipos de cáncer más frecuentes. Ecuador, 2011. [en línea]. [Consulta: 20 octubre 2016] Disponible en: <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/reportes/Grafico1-1.jsp>.
33. **SOTOMAYOR, H.** *Caracterización de un matorral de quila (Chusquea montana Phil.) utilizado como recurso de ramoneo en la zona húmeda de la Región de Aysén - Patagonia*. [en línea] (Tesis). Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 2013. pp. 5-6. [Consulta:

- 30 octubre 2016] Disponible en:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fas718c/doc/fas718c.pdf>.
34. **TAMBUSSI, E.A.** *Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio* [en línea] (Tesis). Universitat de Barcelona. Barcelona-España. 2012. pp. 5-15. [Consulta: 30 octubre 2016] Disponible en:
http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/36093/1/01.EAT_Part_1_2_Introduccion_Objetivos.pdf.
35. **TARAZONA, I.** *Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de filtros uv: de los productos cosméticos al cuerpo humano y al medio ambiente* [en línea] (Maestría). UNIVERSITAT DE VALÈNCIA. Valencia-España. 2015. pp. 20-22 [Consulta: 2 noviembre 2016] Disponible en:
[http://mobiroderic.uv.es/bitstream/handle/10550/45170/Tesis Doctoral Isuha María Tarazona Teruel.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://mobiroderic.uv.es/bitstream/handle/10550/45170/Tesis%20Doctoral%20Isuha%20María%20Tarazona%20Teruel.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
36. **ULLOA ULLOA, C. y JORGENSEN, P.M.** *Trees and shrubs of the Andes of Ecuador*. 2011 [en línea]. [Consulta: 10 noviembre 2016] Disponible en:
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=107037.
37. **ÚMARIEGA, M.A.G.O., et. al.** "La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana". *Theoriavol* [en línea], 2009, 18(2), pp. 69-80. ISSN 0717-196X [Consulta: 11 noviembre 2016] Disponible en: <http://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/194/v/v18-2/06.pdf>
38. **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.** *La Fotosíntesis*. España, 2003 [en línea]. [Consulta: 11 noviembre 2016] Disponible en:
[http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_11.htm#Las plantas C4](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_11.htm#Las%20plantas%20C4).
39. **VARAS, D.** *Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC* [en línea] (Tesis) . Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 2004 . [Consulta: 15 noviembre 2016] Disponible en:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fcv288a/pdf/fcv288a.pdf>.
40. **VEGA, M.** *Etnobotánica de la Amazonia peruana*. Quito-Ecuador. Ediciones Abya-Yala. 2001. pp. 124-128.

41. **VIOLANTE, I.M.P., 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. 452-457. ISSN 0102695X. DOI 10.1590/S0102-695X2009000300020. [Consulta: 15 noviembre 2016] Disponible en: http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/1787/1239
42. **WU, S.J. y NG, L.T.** "Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan" . *LWT -Food Science and Technology* [en línea], 2008, (Taiwan) 41(2), pp. 323-330. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2007.03.003. [Consulta: 15 noviembre 2016] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643807001181>

ANEXOS

Anexo A: Análisis estadístico del extracto etanólico de Chusquea sp

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,170)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,165)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
OCT, 20 ppm	3	0	1,058	0,929	0,537
PAD, 20 ppm	3	0	1,262	1,098	0,634
Ch. 20 ppm	3	0	1,078	0,512	0,295
Ch. 200 ppm	3	0	3,581	1,103	0,637
Ch. 2000 ppm	3	0	10,616	3,530	2,038

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	202,422	50,605	15,807	<0,001
Residual	10	32,015	3,201		
Total	14	234,437			

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

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

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

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
OCT, 20 ppm vs. Ch. 2000 ppm	9,558	6,542	<0,001	Yes
OCT, 20 ppm vs. Ch. 200 ppm	2,523	1,727	0,306	No
OCT, 20 ppm vs. PAD, 20 ppm	0,204	0,140	1,000	Do Not Test
OCT, 20 ppm vs. Ch. 20 ppm	0,0208	0,0143	1,000	Do Not Test

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

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,170)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,165)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
OCT, 20 ppm	3	0	1,058	0,929	0,537
PAD, 20 ppm	3	0	1,262	1,098	0,634
Ch. 20 ppm	3	0	1,078	0,512	0,295
Ch. 200 ppm	3	0	3,581	1,103	0,637
Ch. 2000 ppm	3	0	10,616	3,530	2,038

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	202,422	50,605	15,807	<0,001
Residual	10	32,015	3,201		
Total	14	234,437			

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

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

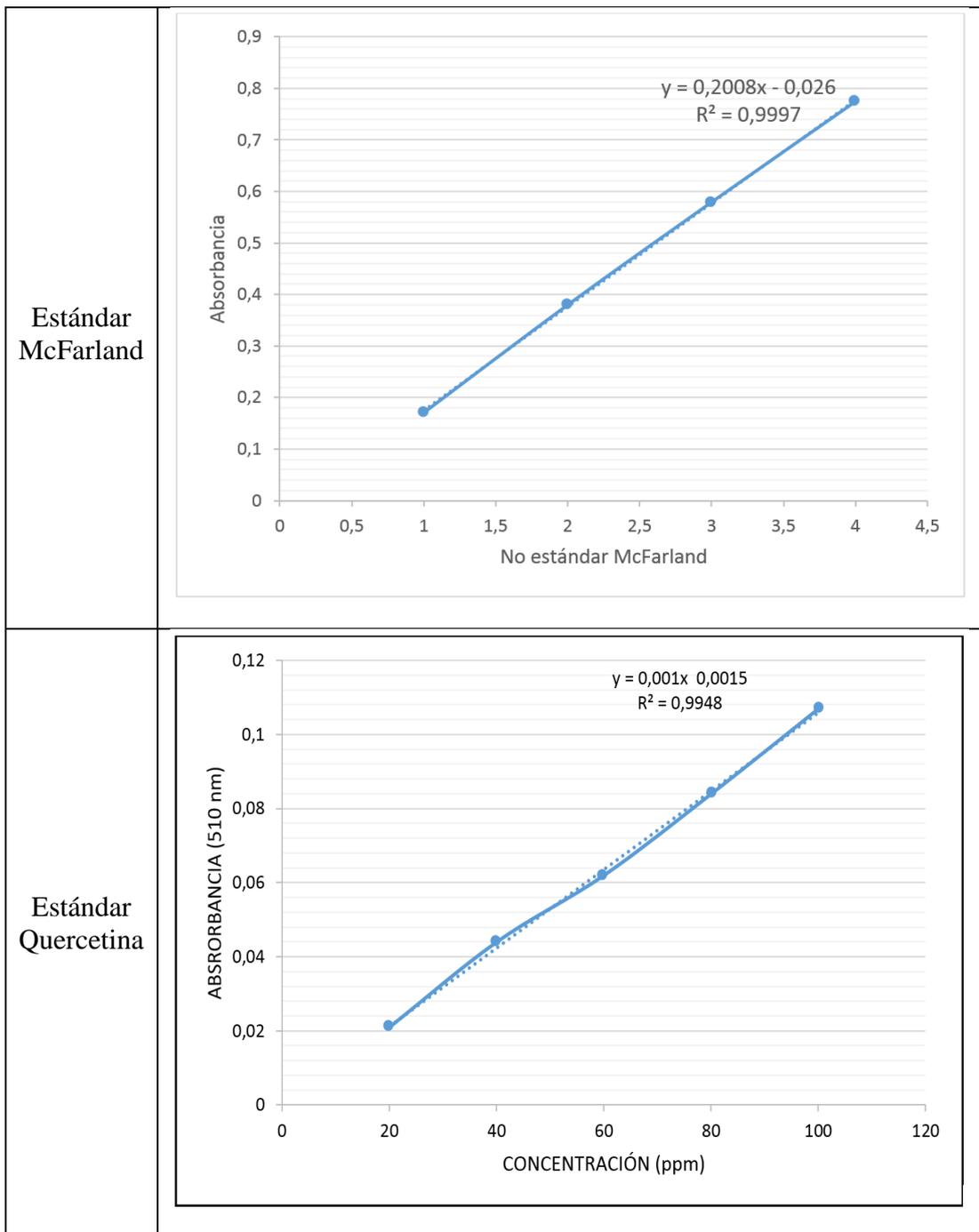
Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
PAD, 20 ppm vs. Ch. 2000 ppm	9,354	6,403	<0,001	Yes
PAD, 20 ppm vs. Ch. 200 ppm	2,319	1,587	0,370	No
PAD, 20 ppm vs. OCT, 20 ppm	0,204	0,140	1,000	Do Not Test
PAD, 20 ppm vs. Ch. 20 ppm	0,183	0,126	1,000	Do Not Test

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

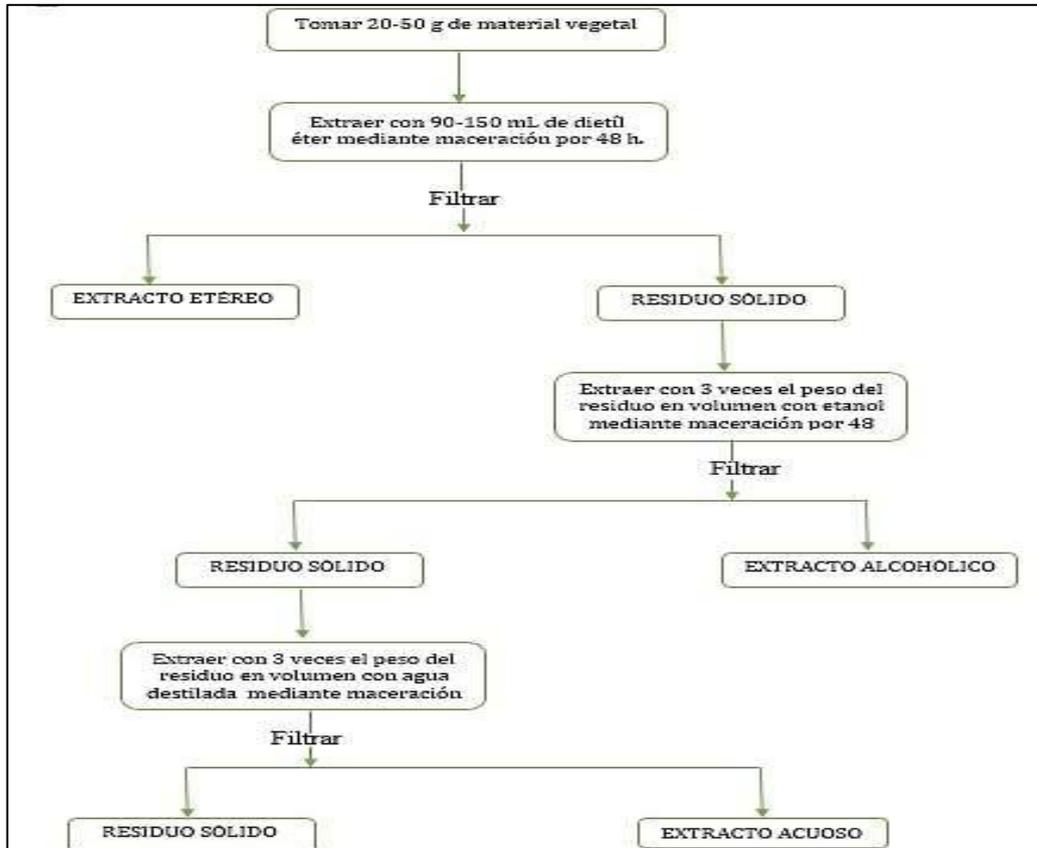
Anexo B: Curva de calibración Mcfarland y Quercetina

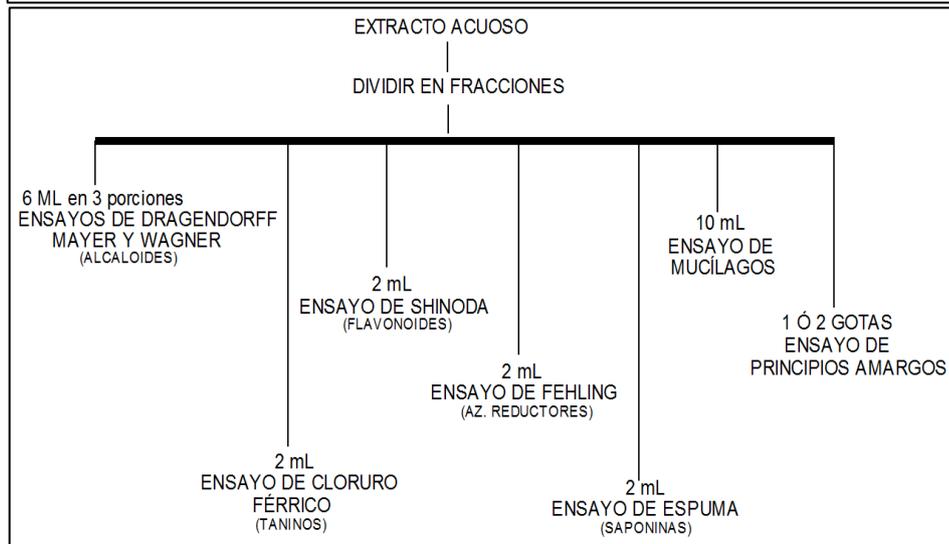
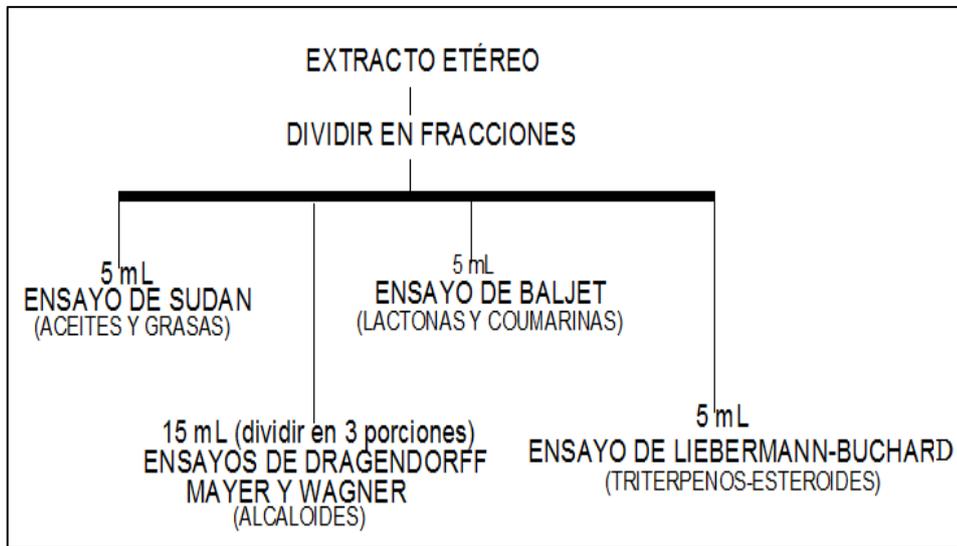
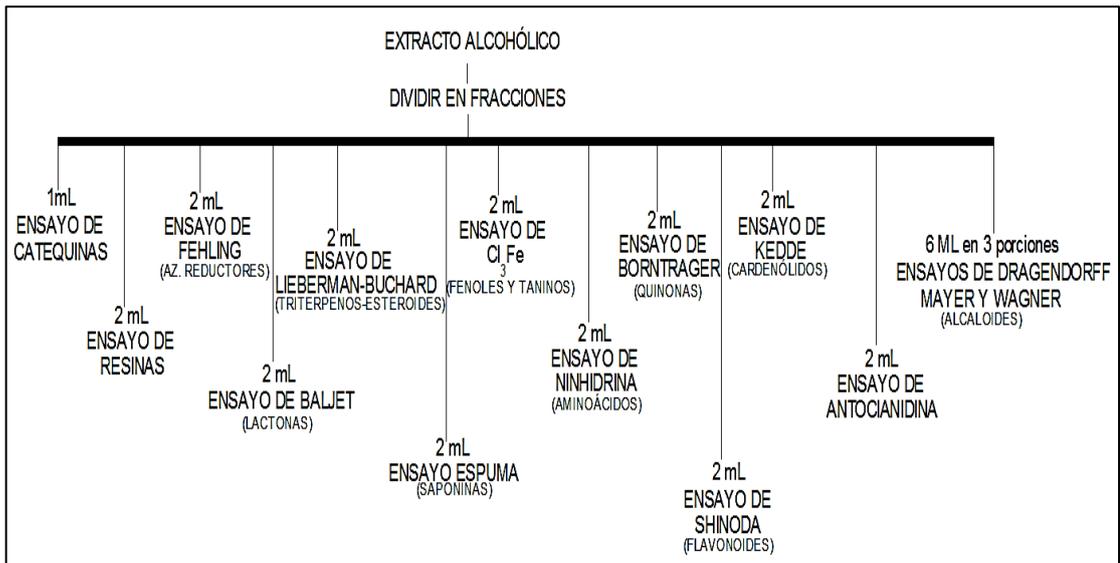


Anexo C: Control de calidad de la droga cruda



Anexo D: Screening fitoquímico





Anexo E: Obtención del extracto seco de *Chusquea sp*



Anexo F: Método de muerte celular inducida



Anexo F: Autorización de Investigación Científica otorgada por el MAE.



Oficio Nro. MAE-DPACH-2016-1527

Riobamba, 26 de septiembre de 2016

Asunto: SOLICITA PERMISO INVESTIGACIÓN

Señor
Diego Mauricio Proaño Rodríguez
Estudiante
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta al Documento No. MAE-DPACH-2016-1727, donde solicita la emisión de la autorización de investigación científica del tema "Determinación de la actividad fotoprotectora *in vitro* de los extractos de *chusquea sp.*", la cual de la valoración técnica del proyecto realizada por el Ing. Miguel Acuña, una vez cumplido el pago del mismo, me permito extender la autorización de investigación científica Nro. 008-IC-DPACH-MAE-2016, elaborada por la Mvz. María Astudillo. Recomendando la lectura de la misma para conocer las obligaciones que asume usted al ser investigador principal.

Para movilizar muestras debe contar con la respectiva guía de movilización, la cual se obtiene en las oficinas de la DPACH.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,



Documento firmado electrónicamente

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

Referencias:
- MAE-DPACH-2016-1727

Anexos:
- autorización-proaño-rodriguez.pdf

Papel Ecológico

* Documento generado por Clapox

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO
Av. 9 de Octubre y Duchicó, Quinta Macal
Riobamba - Ecuador
Código Postal: 960103
Teléfono: (033 3) 2913025
www.chimborazo.gob.ec

1/2