



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

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

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MAYRA ELIZABETH GUAITA BARAHONA

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

Riobamba-Ecuador

2018

©2018, Mayra Elizabeth Guaita Barahona

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 de Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de Titulación de Tipo Experimental: **“DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOTOPROTECTORA, GENOTÓXICA Y DE IRRITACIÓN OCULAR *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Lippia scorodonioides*”** de responsabilidad de la señorita Mayra Elizabeth Guaita Barahona, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

2018-05-15

BQF. Diego Vinuesa Tapia, M.Sc

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

2018-05-15

Dra. Elizabeth Escudero

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Mayra Elizabeth Guaita Barahona, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba, 03 de marzo del 2018

Mayra Elizabeth Guaita Barahona

Cédula de Identidad 050434635-4

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Mayra Elizabeth Guaita Barahona, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

MAYRA ELIZABETH GUAITA BARAHONA

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación se lo dedico a mis padres, ya que con su infinito amor, paciencia, sacrificio y ejemplo de constancia han sido los pilares fundamentales para lograr esta meta en mi vida profesional. A mis hermanos, Eduardo, Glenda, Mishel, María de los Ángeles (+) y Amalia por ser mi ejemplo a seguir, por la ayuda incondicional y por el amor que les tengo. A mi sobrino Benjamín por ser mi inspiración de superación constante y por alegrarme la vida con tu sonrisa. A mi persona especial, Alexis por tu apoyo constante, paciencia y amor.

Mayra Guaita

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios todo poderoso por el regalo de la vida, la salud y la familia. Por iluminar mi camino hacia la meta, cuando más oscuro se veía.

A mi amada madre Luz Barahona, por ser siempre ese ángel en la tierra, quien, con su amor, sus consejos y su bendición, me llenaban de energía para el inicio de una nueva semana.

A mi querido padre, José Guaita, quién con su carácter y ejemplo supo educarme para ser una persona de bien y lograr mis objetivos trazados.

A mi hermano, Eduardo, quien ha sido mi amigo, mi ejemplo a seguir, por tener siempre una respuesta a mis preguntas, por ayudarme incondicionalmente sin importar la hora, ni el momento. A mi cuñada Amalia, por brindarme ese ejemplo de persona bondadosa, luchadora y perseverante. A mi querido Benjamín porque tan solo un abrazo es necesario para brindarme esa paz y tranquilidad que se necesita.

A mis hermanas Glenda y Mishel, mis amigas, mis confidentes, por estar en momentos de tristeza, dolor, alegría, por secar mis lágrimas y aplaudir mis triunfos, por esas palabras de aliento en el momento preciso.

A, mi novio, Alexis, quien ha estado presente en los buenos y malos momentos, por el amor, la comprensión, el apoyo y paciencia por hacer de mi vida más hermosa y feliz.

A mis amigas, Johanna y Diana, quienes fueron mi familia en esta ciudad extraña en un inicio, con quienes compartimos tantos momentos, tristezas, sustos y alegrías.

A todos mis familiares, amigos y compañeros quienes de una u otra forma aportaron un granito de arena para mi desarrollo en mi vida tanto profesional como personal.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por ser ente institucional de sabiduría y formación profesional

Al grupo de investigación GIPRONAF en especial a mi tutor BQF. Diego Vinueza, quien ha sabido inculcar sus conocimientos, experiencias y sabiduría para el desarrollo de este trabajo de investigación. De la misma manera a la Dra. Elizabeth Escudero, por los conocimientos impartidos y por su aporte necesario para el desarrollo de este trabajo.

Mayra Guaita

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

UV	Ultra violeta
IR	Infra rojo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
INAMHI	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología
CBC	Carcinoma Basocelular
ATCC	American Type Culture Collection
mg	Miligramo
g	Gramo
mL	Mililitro
μL	Microlitro
W/m ²	Intensidad de radiación
OMC	etilhexil metoxicinamato
ppm	partes por millón
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
FPS	Factor de protección solar
UFC	Unidades formadoras de colonia
HET-CAM	Prueba de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina
CAM-TBS	Prueba de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina mediante el test de colorante azul tripán
PMN	Prueba de Micronúcleos

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iv
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	viii
TABLA DE CONTENIDO.....	xix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xviii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xix
RESUMEN.....	xx
SUMMARY	xxi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1 MARCO TEÓRICO	7
1.1 Luz solar.....	7
1.2 Radiación UV.....	7
<i>1.2.1 Rayos UV-A.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.2 Rayos UV-B</i>	<i>8</i>
<i>1.2.3 Rayos UV-C</i>	<i>8</i>
1.3 Índice Ultra Violeta (IUV).....	8

1.4	Factores que determinan la intensidad de la radiación UV	9
1.5	Daño producido por radiación ultravioleta en macromoléculas	10
1.6	Efectos de la Radiación UV en la Salud	11
<i>1.6.1</i>	<i>Quemaduras Solares</i>	11
<i>1.6.2</i>	<i>Fotoenvejecimiento de la piel</i>	12
<i>1.6.3</i>	<i>Efectos oculares</i>	12
<i>1.6.4</i>	<i>Sistema Inmunológico</i>	13
<i>1.6.5</i>	<i>Cáncer de piel</i>	13
1.7	Fotoprotección	16
<i>1.7.1</i>	<i>Fotoprotección Intrínseca</i>	17
<i>1.7.2</i>	<i>Fotorprotección Exógena</i>	17
1.8	Fotoprotectores	18
<i>1.8.1</i>	<i>Filtros físicos o inorgánicos</i>	19
<i>1.8.2</i>	<i>Filtros químicos u orgánicos</i>	19
<i>1.8.3</i>	<i>Filtros biológicos</i>	20
1.9	Factor de protección solar (FPS)	20
1.10	Seguridad de Fotoprotectores	22
1.11	Metabolitos con actividad fotoprotectora	22
<i>1.11.1</i>	<i>Mecanismo de acción frente a la radiación UV</i>	25
1.12	Estándar McFarland	25
<i>1.13</i>	<i>Escherichia coli</i>	26
1.14	ATCC	26
1.15	Muerte celular inducida	27
1.16	Ensayo de Genotoxicidad	27
<i>1.16.1</i>	<i>Prueba de Micronúcleos (PMN)</i>	27
1.17	Ensayo de Irritación ocular	28

1.18	<i>Lippia</i>	29
1.19	<i>Lippia scorodonioides</i>	30
1.19.1	<i>Nombres vulgares</i>	30
1.19.2	<i>Nombre científico</i>	31
1.19.3	<i>Origen</i>	31
1.19.4	<i>Usos</i>	31
1.19.5	<i>Características</i>	31
1.19.6	<i>Recolección</i>	31

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	32
2.1	Lugar de investigación	32
2.2	Recolección del material vegetal	32
2.3	Acondicionamiento del material vegetal	32
2.4	Control de calidad de la materia vegetal	33
2.4.1	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	33
2.4.2	<i>Determinación de cenizas totales</i>	33
2.4.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	34
2.4.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	35
2.5	Tamizaje Fitoquímico	35
2.6	Obtención del Extracto seco de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i>	37
2.6.1	<i>Determinación del control de calidad del extracto hidroalcohólico de Lippia scorodonioides</i>	37
2.6.2	<i>Liofilización</i>	38
2.7	Determinación de fenoles totales	38
2.8	Determinación de flavonoides totales	39
2.9	Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH*	39

2.10	Preparación del estándar McFarland	41
2.11	Determinación de la actividad fotoprotectora por el método de muerte celular inducida sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	42
2.11.1	<i>Análisis estadístico de los datos</i>	43
2.12	Determinación del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i>, por el método de Mansur.....	43
2.13	Ensayo de irritación ocular	44
2.13.1	<i>HET-CAM</i>	44
2.13.1	<i>CAM-TBS</i>	44
2.14	Ensayo de Genotoxicidad	46
2.14.1	<i>Análisis estadístico de datos</i>	48
 CAPÍTULO III		
3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS ...	49
3.1	Control de calidad de la materia vegetal.....	49
3.1.1	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	49
3.1.2	<i>Determinación de cenizas totales</i>	50
3.1.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	50
3.1.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	50
3.2	Tamizaje Fitoquímico	51
3.3	Determinación del control de calidad del extracto hidroalcohólico de <i>Lippia scorodonioides</i>.....	53
3.4	Extracto seco de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i>	54
3.5	Determinación de fenoles totales.....	54
3.6	Determinación de flavonoides totales	56
3.7	Determinación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH*	57
3.8	Preparación del estándar McFarland	59
3.9	Efecto de fotoprotección por el método de muerte celular inducida sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	60

3.9.1	Análisis estadístico	64
3.10	Factor de protección solar (FPS)	65
3.11	Ensayo de Irritación Ocular	66
3.11.1	HET-CAM	67
3.11.1	CAM-TBS	67
3.12	Ensayo de Genotoxicidad	69
3.12.1	Análisis estadístico de datos	70
	CONCLUSIONES	74
	RECOMENDACIONES	75
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Fitzpatrick tipo de piel y respuesta a la radiación ultravioleta	14
Tabla 2-1: Categoría de FPS según COLIPA	21
Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	26
Tabla 4-1: Clasificación taxonómica de <i>Lippia scorodonioides</i>	30
Tabla 1-2: Escala de concentración del estándar a diferentes proporciones de BaCl ₂ y H ₂ SO ₄	41
Tabla 2-2: Clasificación en categorías de puntajes acumulados en la prueba HET-CAM	45
Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de <i>Lippia scorodonioides</i>	49
Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i>	51
Tabla 3-3: Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de <i>Lippia scorodonioides</i>	53
Tabla 4-3: Absorbancias del estándar de ácido gálico	54
Tabla 5-3: Contenido de fenoles totales de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i>	55
Tabla 6-3: Absorbancias del estándar de Quercetina.....	56
Tabla 7-3: Contenido de flavonoides totales de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i> C57	
Tabla 8-3: Resultados de la actividad Antioxidante IC50 del extracto de <i>Lippia scorodonioides</i>	58
Tabla 9-3: Resultados de las absorbancias del Estándar McFarland a 625 nm.....	59
Tabla 10-3: Efecto fotoprotector del control positivo etilhexil metoxicinamato (OMC)	60
Tabla 11-3: Efecto fotoprotector del control positivo octildimetil-PABA	60

Tabla 12-3: Efecto fotoprotector del extracto Hidroalcohólico de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i>	61
Tabla 13-3: Test de ANOVA de un factor para la actividad fotoprotectora	64
Tabla 14-3: Resultados del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i>	65
Tabla 15-3: Resultados del Método HET-CAM de los controles y de los extractos de <i>Lippia scorodonioides</i>	67
Tabla 16-3: Resultados del Método CAM-TBS de los controles y de los extractos de <i>Lippia scorodonioides</i>	68
Tabla 17-3: Resultados del Ensayo de Genotoxicidad de los controles y del extracto de <i>Lippia scorodonioides</i> en raíces de las células de <i>Vicia faba</i> a las 48H	69
Tabla 18-3: Test de Chi cuadrado para el índice mitótico de los controles y el extracto de <i>Lippia scorodonioides</i>	70
Tabla 19-3: Test de Chi cuadrado para el índice de micronúcleos de los controles y el extracto de <i>Lippia scorodonioides</i>	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Grados de índice UV, recomendaciones y nivel de riesgo.....	9
Figura 2-1: Espectro de luz visible e invisible en el ojo	12
Figura 3-1: carcinoma de células basales.....	15
Figura 4-1: carcinoma de células escamosas	16
Figura 5-1: Melanoma Maligno	16
Figura 6-1: Resumen de los factores que afectan significativamente el factor de protección ultravioleta de los tejidos.....	18
Figura 7-1: Niveles de intensidad solar y el FPS	21
Figura 8-1: Dossier Internacional de Seguridad de los fotoprotectores de acuerdo con los requerimientos de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón	22
Figura 9-1: Estructura de los principales Flavonoides.....	24
Figura 10-1: Estructura de la Quercetina	24
Figura 11-1: Comparación del estándar McFarland 0,5 y la suspensión bacteriana.....	25
Figura 12-1: <i>Lippia scorodonioides</i>	30
Figura 13-1: <i>Lippia scorodonioides</i>	30
Figura 1-2: Preparación de extractos para realizar el tamizaje fitoquímico	36
Figura 2-2: Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.....	36
Figura 3-2: Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.....	37
Figura 4-2: Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso	37
Figura 5-2: Tabla de los valores de EE X I preestablecidos	44

Figura 6-2: Clasificación de las sustancias de acuerdo al potencial irritante determinado por el método CAM-TBS.	46
Figura1-3: Curva de calibración del colorante azul Tripán en formamida	68

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Curva de calibración del ácido Gálico.....	55
Gráfico 2-3: Curva de calibración de Quercetina	56
Gráfico 3-3: Curva de calibración del estándar McFarland	59
Gráfico 4-3: Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de <i>Escherichia. coli.</i> por UV-B Blanco, OMC 20 ppm, PAMIDATO 20 ppm, <i>Lippia scorodonioides</i> 20 ppm	61
Gráfico 5-3: Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de <i>Escherichia. coli.</i> por UVB Blanco, OMC 200 ppm, PAMIDATO 200 ppm, <i>Lippia scorodonioides</i> 200 ppm.....	62
Gráfico 6-3: Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de <i>Escherichia. coli</i> por UV-B Blanco, OMC 2000 ppm, PAMIDATO 2000 ppm, <i>Lippia scorodonioides</i> 2000 ppm.....	62
Gráfico 7-3: Resultados del FPS de <i>Lippia scorodonioides</i> , OMC, Pamidato <i>in vitro</i>	65
Gráfico 8-3: Gráfico del índice mitótico del extracto de <i>Lippia scorodonioides</i> y los controles	71
Gráfico 9-3: Gráfico del índice de micronúcleos del extracto de <i>Lippia scorodonioides</i> y los controles	72

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Análisis estadístico de la actividad fotoprotectora.

Anexo B: Análisis estadístico de la actividad Genotóxica

Anexo C: Evidencias fotográficas del trabajo de investigación

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de titulación fue determinar la actividad fotoprotectora *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* a 20, 200 y 2000 ppm, así como la capacidad del extracto para causar irritación ocular y genotoxicidad a diferentes concentraciones siendo la máxima 500 ppm. Se llevó a cabo el acondicionamiento y control de calidad de la droga cruda. Mediante tamizaje fitoquímico se identificó la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. El extracto seco de *Lippia scorodonioides* se obtuvo por un proceso de concentración y posterior liofilización del extracto hidroalcohólico. El contenido de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante (utilizando DPPH*), (FPS) factor de protección solar (ecuación de Mansur); se cuantificaron por métodos espectrofotométricos. La capacidad de irritación ocular del extracto se determinó por el método del HET-CAM y CAM-TBS. La actividad genotóxica fue evaluada por la prueba de micronúcleos en semillas de *Vicia faba*. Se determinó la actividad fotoprotectora *in vitro* a través del método de muerte celular inducida por radiación UVB sobre *Escherichia coli* ATCC 25922. El número de UFC sobrevivientes se detectó en intervalos de 30 minutos durante 3 horas. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue de 1.148 mg GAE/100 g extracto seco y 0.30 mg QE/100 g de extracto seco respectivamente. La capacidad antioxidante tuvo un IC_{50} 1004.89 μ g/mL. El extracto presentó un FPS de 0.75 a 10 ppm a diferencia del OMC y Pamidato que obtuvieron valores de 12.50 y 17.81, respectivamente. El extracto hidroalcohólico presentó un efecto fotoprotector bajo, con un crecimiento bacteriano hasta los 60 minutos, menor que el presentado por los controles OMC y Pamidato que fue hasta los 120 minutos. El extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* no presentó irritación ocular ni capacidad de inducir genotoxicidad. Se recomienda realizar más estudios a *Lippia scorodonioides* ya que no existen estudios realizados a esta especie.

Palabras clave: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <CEDRONCILLO (*Lippia scorodonioides*)>, <ATIVIDAD FOTOPROTECTORA>, <FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR (FPS)>, <ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE>, <RADIACIÓN UVB>, <*Escherichia coli* (BACTERIA)>, <HET-CAM>, <CAM-TBS>, <GENOTOXICIDAD>.

SUMMARY

The purpose of the current graduation work was to determine the *in vitro* photoprotective activity of *Lippia scorodonioides* hydroalcoholic extract at 20, 200 and 2000 ppm as well as the capacity of the extract to cause eye irritation and genotoxicity at different concentration, being 500 ppm the highest concentration. The conditioning and quality control of the raw drug was carried out. Through a phytochemical sieving, it was possible to identify the presence of phenolic compounds and flavonoids. The *Lippia scorodonioides* dry extract was obtained through a concentration process and the subsequent lyophilization of the hydroalcoholic extract. The total phenol and flavonoids, antioxidant capacity (using DPPH*), Sun Protection Factor (SPF) Mansur's equation were quantified through spectrophotometric methods. The eye irritation capacity of the extract was determined by the HET-CAM and CAM-TBS method. The genotoxic activity was evaluated with the *Vicia faba* –seed micronuclei test. It was possible to determine the *in vitro* photoprotective activity through the UVB radiation-induced cell death on *Escherichia coli* ATCC 25922. The number of surviving UFC (Unit Forming Colonies) was detected in 30-minute intervals, during 3 hours. The total phenol and flavonoids content was 1.148mg GAE/100g dry extract and 0.30mg QE/100g of dry extract respectively. The antioxidant capacity was IC50 1004.89µg/mL. The extract presented a sun protector Factor of 0.75 to 10 ppm unlike OMC and Pamidato that obtained values of 12.50 and 17.81 respectively. The hydroalcoholic extract presented a low photoprotective effect with a bacteria proliferation until 60 minutes less than the one presented by the OMC controls and Pamidato that was until 120 minutes. The *Lippia scorodonioides* hydroalcoholic extract did not present nor eye irritation or capacity to induce genotoxicity. It is recommended to carry out more studies for *Lippia scorodonioides* since there is no any study on this species.

Key words: < EXACT AND NATURAL SCIENCES >, < *Lippia scorodonioides* CEDRON FAMILY >, < PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY>, < (FSP) SUN PROTECTION FACTOR >, <ANTIOXIDANT ACTIVITY>, < UVB RADIATION >, <*Escherichia coli* (BACTERIA) >, <HET-CAM>, <CAM-TBS>, < GENOTOXICITY >.

INTRODUCCIÓN

El sol es conocido como el astro rey desde los orígenes del hombre, por ser considerado como fuente de calor, luz y vida e incluso en diversas culturas antiguas se le ha asignado un rol divino asociado a la sanación (Kessinger, 2003 citado en Sordo y Gutierrez, 2013). Su presencia es importante para todo ser vivo es así como, las plantas lo necesita para realizar la fotosíntesis, en las personas estimula la producción de vitamina D3, implicada en el metabolismo óseo y el buen funcionamiento inmune, además de ello los rayos solares han sido utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades como eczema, el raquitismo y la psoriasis (OMS, 2003a). Sin embargo, a pesar de presentar beneficios también puede llegar a ser muy perjudicial para la salud al causar daños en la piel provocados por los rayos UV que emite el sol.

Debido a la creciente contaminación indiscriminada del medio ambiente, la capa de ozono , la cual nos protege de la radiación UV, ha sufrido una degradación acelerada, lo que permite que gran parte de esta radiación llegue a la superficie terrestre (Vega, 2008, p.23). La radiación solar frecuentemente impacta la Tierra con aproximadamente el 50% de luz visible (400-800 nm), 40% IR (1300-1700 nm) y el 10% de radiación UV (10-400 nm). La radiación UV se divide en UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) y UV-C (100-290 nm) (Ávila Acevedo et al, 2005, pp.301-309).

La radiación UVB conocida como “radiación de quemaduras” es la responsable de gran parte de los daños biológicos producidos por la luz solar, ya que es capaz de penetrar en la epidermis actuando a nivel de la capa basal de células y por consiguiente dañando el genoma de los queratocitos, desencadenando una serie de reacciones como detención del ciclo celular, estimula la síntesis de ADN, fotoenvejecimiento prematuro, fotocarcinógenos , la producción de radicales libres en la zona irradiada debido al estrés oxidativo, induce cáncer de piel (no melanoma) de tipo escamoso y carcinoma de células basales y cataratas (González et al, 2009, pp.69-80).

La radiación UVA, penetra profundamente afectando la dermis, destruyendo fibras elásticas y colágenas, induciendo el envejecimiento, reacciones fotoalérgicas, inmunosupresión, daño estructural del ADN y formación de cáncer, actuando de esta manera de forma sinérgica con la UVB (Sordo y Gutierrez, 2013, pp.113-117).

Es importante conocer que los efectos de la Radiación UV en la piel, son acumulativas, irreversibles y actualmente un gran problema de salud (Cefali et al, 2016, pp.1-8).

La Organización Mundial de la Salud establece que el índice UV tolerable para el ser humano es de 11 W/m². La Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA), en el Informe HIPERIÓN manifiesta que, en la ciudad de Guayaquil se ha registrado índices superiores a 14 W/m², mientras que en la ciudad de Quito se ha detectado índices desde 16 W/m² y en ocasiones llegando hasta 25 W/m² (EXA, 2008).

Uno de los factores que determina la alta radiación solar, es la ubicación geográfica del Ecuador, debido a que estamos cerca de la línea Equinoccial, más próximos al sol por lo cual los rayos caen perpendicularmente. Esto hace que sea mayor la radiación. Según el Inamhi, las ciudades con mayor altitud como Quito o Riobamba, superan una radiación de los 19 puntos, de acuerdo a los datos registrados en el 2015 (El comercio, 2016).

Mientras que el 13 de marzo del 2018, el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (Inamhi) informó que, en la región interandina, la radiación UV podría alcanzar hasta los 17 puntos, siendo un valor extremadamente alto de acuerdo a lo establecido por la OMS, Por lo que se advierte que se deben tener medidas de precaución ante el sol entre las 10:00 am y las 16:00 del día (El Comercio, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año, se produce en todo el mundo entre 2 y 3 millones de casos de cáncer de piel (no melanoma), que rara vez son fatales y aproximadamente 130,000 casos de melanomas malignos. La tasa de mortalidad va en ascenso sobre todo en poblaciones de piel blanca, estimando así que existen 66,000 muertes, anualmente por melanomas y otros cánceres de piel. Por otra parte, en todo el mundo, entre 12 y 15 millones de personas quedan ciegas por cataratas anualmente, de las cuales un 20% puede ser causado por la exposición al sol (WHO, 2003).

Según la OMS, en el 2008 más de 7,6 millones de personas fallecieron a causa del cáncer, lo que representó aproximadamente, un 13% del total de defunciones, constituyendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Ministerio de Salud Pública, 2013). En Ecuador el número de personas que padecen cáncer de piel se ha incrementado 500 veces, en los últimos 5 años, de acuerdo con un estudio elaborado por la Fundación Ecuatoriana de Psoriasis-Fepso (La Hora, 2011).

Las tasas estandarizadas de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) en Ecuador, reportó que en el 2010 en Guayaquil se detectó 22,8 casos de melanoma de piel en mujeres y un 27,8 en hombres, y en Quito se ha reportado 35,6 en hombres y 30,1 en mujeres por cada 100.000 habitantes, constituyéndose en el segundo tipo de cáncer más frecuente (SOLCA, 2010)(SOLCA, 2014, citado en Guzmán y Tello, 2012).

Debido a este gran problema de salud, es necesario tomar medidas de protección y una de ellas es el uso de protectores solares. En la actualidad existen en el mercado dos tipos básicos de filtros solares: los físicos (compuestos inorgánicos), y los químicos (sustancias orgánicas), pudiendo ser estos de origen sintético o vegetal (Luengo, 2015, pp.29-31).

Los filtros físicos formados por compuestos inorgánicos como dióxido de titanio y óxido de zinc, tienen un amplio rango de protección UV, pero poseen la desventaja de favorecer la aparición de lesiones en la piel iniciando con la presencia de acné, es decir tiene un efecto comedogénico. Los filtros químicos, tienen compuestos orgánicos, actúan absorbiendo la radiación, los más comunes son etilexil-salicilato o ácido para-aminobenzoico (PABA), cinamatos, benzofenonas, entre otras, poseen la desventaja de atravesar capas profundas de la piel, presentando absorción sistémica lo que puede generar la aparición de efectos tóxicos (Luengo, 2015, pp.29-31).

Según estudios se ha demostrado que las benzofenonas, ampliamente utilizado en fotoprotectores, han sido detectados en tejidos de peces y en el ambiente acuático, así como en la orina humana y en la leche materna, e incluso estas sustancias pueden llegar a actuar como disruptores endócrinos (Watanabe, et al , 2015, pp.119-128). Es decir que estas sustancias son capaces de imitar a las hormonas naturales del organismo, haciendo que las mismas se confundan y activen o bloqueen funciones importantes para la supervivencia (Chichizola, 2003, pp.172-188).

La mayoría de disruptores endócrinos, interfieren con las hormonas esteroideas, fundamentalmente con los estrógenos, que intervienen en el buen desarrollo y funcionamiento del sistema reproductor masculino y femenino; por lo que al actuar sobre estos sistemas pueden provocar desde la disminución en la producción de espermatozoides hasta el incremento de tumores testiculares, mamarios, ováricos, etc. (I. O. Martínez, 2014).

Otro caso preocupante es la exposición de las mujeres embarazadas a estas sustancias ya que pueden llegar a causar cambios en el entorno hormonal intrauterino lo que conlleva a fracaso en el desarrollo del feto o incluso trastornos reproductivos u otras enfermedades (Krause et al, 2018, pp.51-60).

Los agricultores se ven mayormente afectados a los efectos negativos de las benzofenonas, debido a que han sido motivados a utilizar los fotoprotectores para reducir el riesgo de cáncer de piel por la constante exposición al sol, y se ha informado que las benzofenonas aumentan la absorción dérmica de los pesticidas (Watanabe, et al , 2015, pp.119-128).

En referencia a toda esta información, se está buscando ampliamente extractos de plantas y productos naturales que puedan ser incluidos en formulaciones, además que sean biodegradables, que tengan baja toxicidad, propiedades fitoquímicas y sobre todo que estén al alcance de toda la población. Algunos extractos de plantas tienen compuestos que actúan como filtros solares como

antioxidantes, y que pueden actuar como moduladores de mecanismos de defensa y reparación a nivel celular (Cefali, et al, 2016, pp.1-8).

Estudios recientes han informado sobre los efectos beneficiosos de compuestos derivados de plantas, especialmente carotenoides y flavonoides. Los compuestos con anillos aromáticos absorben los rayos UV, especialmente UV-A y UV-B, en un rango de longitud de onda de 200-400 nm, por lo tanto, compuestos fenólicos como los flavonoides puede utilizarse como filtros solares (Cefali, et al, 2016, pp.1-8).

Existiendo una referencia a través del estudio realizado por Ávila Acevedo (Avila Acevedo et al., 2017, pp.72-81).“Efecto fotoemopreventivo de *Lippia graveolens* contra la carcinogénesis cutánea inducida por la radiación UVB”, especie utilizada como condimento en México y que posee compuestos como flavonoides, terpenoides e iridioides. Obteniendo como resultado que absorbe la radiación UV evitando así las quemaduras solares y fotocarcinogenesis.

Es por ello que considerando la mega diversidad de plantas que posee el Ecuador y que pueden crecer hasta en altitudes, en donde existe mayor contacto con la radiación UV, nos hemos propuesto realizar un estudio de la actividad fotoprotectora *in vitro* de *Lippia scorodonioides* a través del método de muerte celular inducida utilizando bacterias *Escherichia coli* ATCC, 25922 y una lámpara UVB, que actúa como un simulador solar, según el método propuesto por (Avila Acevedo et al., 2017, pp.72-81) .

Para garantizar la seguridad del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*, se realizó ensayos como la actividad genotóxica, determinada por la prueba de micronúcleos, utilizando semillas de *Vicia faba* y de irritación ocular utilizando huevos fecundados de gallina después de 10 días de incubación, reemplazando al tradicional test de draize.

Esta investigación se complementa, con el control de calidad de la droga cruda, identificar metabolitos secundarios presentes en *Lippia scorodonioides*, por tamizaje fitoquímico, determinación del factor de protección solar (FPS), según el método espectrofotométrico y la ecuación matemática de Mansur, determinación de la actividad antioxidante, utilizando como estándar el 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) y el cálculo del contenido de flavonoides totales , a través de la curva de calibración de quercetina, utilizado como estándar.

Cabe mencionar que la principal beneficiaria de esta investigación será la ciencia ya que se aportará con información de relevancia, sobre la existencia o ausencia de las actividades ya mencionadas de los extractos hidroalcohólicos de *Lippia scorodonioides*, planta que posee nuestro país.

Por todo lo antes mencionado, este trabajo es de importancia, ya que en nuestra profesión se promueve la investigación; vocación que queremos perdurar y transmitir para que más estudiantes

y profesionales nos unamos con un solo objetivo ayudar a resolver problemas de salud que aquejan a nuestra población, contribuyendo así a dar cumplimiento al objetivo 1 del eje 1 (Derechos para Todos Durante Toda la Vida) del Plan Toda una Vida que hace referencia a garantizar una vida digna con iguales oportunidades para todas las personas.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar las actividades fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Lippia scorodonioides*.

Objetivos Específicos:

Comprobar la calidad de la droga vegetal y del extracto.

Calcular el contenido de fenoles y flavonoides totales, mediante métodos espectrofotométricos.

Determinar la capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH*

Determinar la actividad fotoprotectora de los extractos de *Lippia scorodonioides* a través del método de muerte celular inducida, en cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, por exposición a radiación UVB.

Calcular el factor de protección solar (FPS) *in vitro* de los extractos de *Lippia scorodonioides* por espectrofotometría mediante la ecuación de Mansur

Determinar la capacidad del extracto de *Lippia scorodonioides* para inducir irritación ocular a través de la prueba de irritación sobre membrana corioalantoidea

Determinar la genotoxicidad del extracto, utilizando el ensayo de micronúcleos en *Vicia faba* variedad Minor.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Luz Solar

La luz solar está formada por un conjunto de radiaciones electromagnéticas, de alta frecuencia que se encuentran agrupadas dentro de un rango llamado espectro luminoso. El espectro de luz de mayor frecuencia es la luz ultravioleta, (100 a 400 nm) que favorece el proceso de fotosíntesis o bronceado de la piel, la frecuencia intermedia es la luz visible (400 a 760 nm) y la de menor frecuencia es la infrarroja (760 a 1800 nm) que provee calor, además de estas existen longitudes de onda corta (ionizantes) y larga (microondas y radiofrecuencia) .La intensidad de la radiación varía con la frecuencia, estas radiaciones son modificadas a su paso por la atmósfera por lo que solamente dos tercios de esta energía alcanza a penetrar en la Tierra (Gasquet, 2004, p.196).

1.2 Radiación UV

La radiación ultravioleta (UV), son radiaciones electromagnéticas con longitudes de onda, que van de 100 a 400 nm, dividida en tres bandas: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (100-250 nm). La radiación solar UV, atraviesa la atmósfera terrestre, el ozono, vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono, barreras que absorben toda la radiación UVC, y casi el 90% de la radiación UVB, y en menor cantidad la UVA (Salazar).

La radiación UV es importante para la vida, actúa como catalizadora de vitaminas, contribuye en la fijación de calcio en los huesos e incluso ayuda en el tratamiento de ciertas enfermedades como es el caso de psoriasis, siempre bajo prescripción médica (Salazar). Sin embargo, cuando alcanza a penetrar la piel, una parte es absorbida, otra es reflejada y la otra transmitida a diferentes capas celulares, hasta que la energía de la radiación incidente se disipe. Los cromóforos en la piel, endógenos (ADN, melanina, colesterol) o exógenos (drogas fotosensibilizantes) son los que absorben la radiación y que pueden inducir respuestas fotobiológicas (Morales y López, 2006).

1.2.1 Rayos UV-A

Alcanza longitudes de onda entre 315 y 400 nm, abarca el 97% de la totalidad de la radiación ultravioleta. Del 70-80% de la radiación UVA, es absorbida por melanocitos de la epidermis basal y células de la dermis, razón por la cual favorece la rápida pigmentación de la piel y se emplea en las cabinas de bronceado, pero también puede presentar efectos adversos como pérdida de agua cutánea, alteración de las fibras elásticas de la piel, deterioro de los lípidos epidérmicos y la disfunción de los queratocitos de la epidermis. Es importante saber que este tipo de radiación puede atravesar hasta los vidrios (AZCONA, 2005, pp.50-55).

1.3.2 Rayos UV-B

Representa del 4-5% de toda la radiación ultra violeta, la intensidad de la radiación UVB varía dependiendo el lugar, la franja horaria y la estación del año. El 70 % de radiación UVB es absorbida por el estrato córneo de la epidermis por lo que se considera que estas radiaciones son responsables del enrojecimiento inmediato e induce la pigmentación definitiva de la piel, además de provocar efectos nocivos como fotoinmunosupresión. Además es capaz de alterar el ADN de las células, induciendo así el desarrollo de cánceres cutáneos (AZCONA, 2005, pp.50-55).

1.3.3. Rayos UV-C

Es la más energética de los otros 2 tipos de rayos UV, sin embargo estos rayos son filtrados por la capa de ozono y no logra penetrar la atmósfera terrestre, por lo tanto normalmente no constituye una causa de cáncer de piel (AZCONA, 2005, pp.50-55).

1.3 Índice Ultra Violeta (IUV)

Es la medida que nos informa acerca de la intensidad con la que la radiación ultravioleta llega a la superficie terrestre, su valor es superior a cero y mientras más alto, mayor es la probabilidad de lesiones cutáneas, oculares y su aparición será en el menor tiempo posible

Este índice es una referencia para concientizar a la población sobre los riesgos de la exposición excesiva a la radiación ultravioleta y para advertir la necesidad de utilizar medidas

de protección. Este índice debe ir dirigido principalmente a la población vulnerable y con alta exposición como niños y turistas.

La información sobre el índice ultravioleta debe proporcionar el valor máximo diario y debe presentarse como un valor único entero, sin embargo cuando existe nubosidad el IUV es variable y debe notificarse en un intervalo de valores (OMS, 2003).

Los valores del índice ultravioleta (IUV), se dividen en categorías de exposición:

IUV	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+	
	Bajo			Moderado			Alto		Muy Alto		Extremo	
Color	verde			amarillo			Naranja		Rojo		Morado	
Protección	No			Si. Necesidad de sombra. Usar camisa, crema de protección solar y sombrero						Si, en forma extra. Necesidad de sombra. Imprescindible el uso de camisa, crema de protección solar y sombrero		
Riesgo	Sin riesgo			Horas centrales del día				No salir a las horas centrales del día				

Figura 1-1: Grados de índice UV, recomendaciones y nivel de riesgo

Fuente: (Salazar)

Este índice se dio luego de comprobarse que la dosis efectiva acumulada en un intervalo de tiempo de una hora, en un metro cuadrado de piel humana, está entre 0 y 1500 joule. Para expresarlo de una manera más sencilla se acordó internacionalmente asignarle el número “1” a 100 Joules/m²/hora, “2” a 200 Joules/m²/hora y así sucesivamente hasta llegar al tope de la escala que es el índice 16.0 (Salazar).

1.4 Factores que determinan la intensidad de la radiación UV

La altura del sol: Mientras más alto este el sol, más intensa es la radiación ultravioleta. Por tanto, la intensidad de la radiación varía de acuerdo a la hora del día (entre las 10 a.m. y 2 p.m., se recibe hasta el 60% de la radiación UV) y la época del año (en primavera y verano, los rayos UV son más potentes) (OMS, 2003).

La Latitud: Mientras más cerca de la línea ecuatorial este, mayor será la intensidad con la que llega la radiación ultravioleta.

La Nubosidad: La máxima intensidad de la radiación ultravioleta se da cuando no hay nubes, sin embargo, más del 90%, de la radiación puede atravesar las nubes poco densas (OMS, 2003).

La altitud: Por cada 300 metros que incrementa la altitud, aumenta un 4% la radiación UV

El Ozono: parte de la radiación UV es absorbida por el ozono, sin embargo, la concentración de éste varía a lo largo del día e incluso del año (OMS, 2003).

La reflexión por el suelo: De acuerdo al tipo de superficie, la radiación UV, puede reflejarse o dispersarse, por ejemplo, la arena de la playa puede reflejar un 15% de radiación UV, la espuma del agua de mar un 25% y la nieve reciente hasta un 80% (OMS, 2003).

1.5 Daño producido por radiación ultravioleta en macromoléculas

Dosis prolongadas de radiación ultravioleta sobre la piel generan especies reactivas del oxígeno (ERO's) lo que provoca estrés oxidativo en la zona irradiada y disminuye los niveles de enzima antioxidante. En consecuencia, altera la capacidad de defensa ante los procesos oxidativos producidos por las radiaciones, generando modificaciones oxidativas en el ADN, proteínas y lípidos y posteriores daños biológicos (OlarTE et al., 2016, pp.44-52).

El daño oxidativo del ADN, producido por ERO's, genera la ruptura de la cadena simple y doble, además de cambios de bases nitrogenadas y nucleótidos. La guanina resulta ser susceptible a la oxidación por *O_2 y su modificación origina el 8-hydroxiguanina (8-OHG) (OlarTE et al., 2016, pp.44-52).

El $OH \cdot$ resulta dañino para el ADN ya que puede reaccionar con las 4 bases nitrogenadas y de esta manera altera la función, la expresión de oncogenes y del gen p53, que funciona como un agonista el cual debe proteger del daño al ADN, mediante arresto del ciclo celular, reparando el ADN o llevándolo a apoptosis. La alteración del gen p53 confiere un mayor riesgo de desarrollar cáncer y sobre todo mutación del mismo, siendo frecuentemente uno de los cambios genómicos en el cáncer humano (López et al., 200, pp.21-27).

En los lípidos, las ERO's, al actuar sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados produce liberación de Hidrógeno y de una especie radical carbono ($C\cdot$), este último reacciona dando lugar a lípidos peroxidados e hidroxiperoxidados al robar hidrógenos de otros ácidos grasos adyacentes. Los hidroperóxidos, altamente inestables, pueden combatirse con sistemas enzimáticos, generando el proceso de peroxidación lipídica, sin embargo, es una de las causas principales de pérdida de la función por modificación de la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática (OlarTE et al., 2016, pp.44-52).

Las especies reactivas de oxígeno genera daños oxidativos, en proteínas dérmicas (colágeno y elastina), modifica aminoácidos como el triptófano, tirosina, histidina, cisteína, metionina, formación de grupos carbonilo que favorece la degradación de proteínas, alteración en

estabilidad térmica, fragmentación, cambio de viscosidad y formación de puentes disulfuro. Los aminoácidos aromáticos (tirosina y triptófano) absorben energía de la radiación ultravioleta, dando a las proteínas la función de cromóforos por excelencia en el organismo (Olarte et al., 2016, pp.44-52).

1.6 Efectos de la Radiación UV en la Salud

Luz solar es necesario para los seres vivos, ya que posee efectos positivos es así como en los seres humanos ayuda en la producción de vitamina D (importante para la salud ósea y muscular), tratamiento de enfermedades como la psoriasis y eczema e incluso existe una evidencia observacional que podría contribuir para la prevención de cáncer colorrectal, esclerosis múltiple (Van der Rhee, et al, 2016, pp.34-37).

Sin embargo, la constante exposición a la luz solar y por ende a las radiaciones ultravioletas pueden llegar a ser muy perjudiciales para la salud de los ojos, la piel y el sistema inmunológico.

1.6.1 Quemaduras Solares

Se produce por exposición de una sobredosis de corta duración de radiación ultravioleta, lo que genera la aparición de lesiones agudas inflamatorias en el cutis. Dichas lesiones pueden ser eritema inflamatorio doloroso e incluso puede darse la formación de ampollas. Las quemaduras solares repetidas, sobre todo en niños y jóvenes, incrementan el riesgo de neoformaciones de la piel como nevos, melanomas (Cañarte, 2010).

Las personas con piel blanca son más susceptibles a sufrir quemaduras por el sol. La melanina, pigmento que cumple la función de dar el color a la piel, también nos protege de radiaciones ultravioletas, por lo que la producción de este pigmento incrementa cuando nos exponemos al sol, ya que la melanina absorbe las radiaciones ultravioletas y las convierte en calor (Noriega, 2012).

1.6.2 Fotoenvejecimiento de la piel

Es el envejecimiento prematuro de la piel debido a la exposición constante (durante años) tanto a radiaciones UVA y UVB, se caracteriza por presentar fibras elásticas anormales en la dermis, y por la disminución de diferentes tipos de colágeno, lo que genera la aparición de arrugas, telangiectasias (arañas vasculares), atrofia, pigmentación irregular y aumento de la fragilidad de los vasos sanguíneos (Vallejo et. al, 2013, p.1).

1.6.3 Efectos oculares

Los ojos a pesar de estar protegidos por diversas estructuras como el aro superciliar, las pestañas, las cejas, además de los reflejos de parpadeo para minimizar la penetración de rayos en el ojo. La eficacia de todas estas barreras se ve limitada debido a las condiciones extremas de exposición a la radiación solar como cama solar, la reflexión por la arena, la nieve o el agua (Andre et al., 2015)

El ojo al estar llena de moléculas pigmentadas (cromóforos), absorbe la luz, esto hace que sea muy sensible a las reacciones fotoquímicas. La mayoría de radiaciones UV, son filtradas en particular por el cristalino y la córnea y solo el 1% o menos por la retina. La absorción de la radiación UV a través de los tejidos oculares, depende de la longitud de onda (Andre et al., 2015).

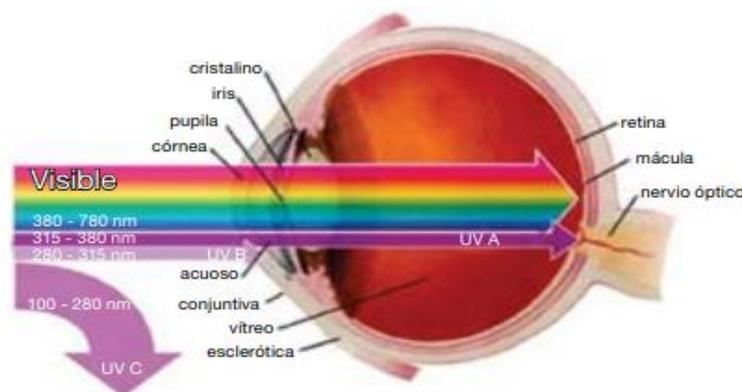


Figura 2-1: Espectro de luz visible e invisible en el ojo
Fuente: (Andre et al., 2015)

Dentro de los efectos agudos producidos por la exposición a los rayos UV, están la fotoqueratitis y la fotoconjuntiva, estas reacciones inflamatorias son muy parecidas a las quemaduras solares, apareciendo pocas horas después de la exposición. Pese a que estas

reacciones pueden ser muy dolorosas, son reversibles sin causar daño largo plazo ni en el ojo ni en la visión (OMS, 2003).

Las cataratas son la opacidad de los cristalinos del ojo. Las exposiciones especialmente a la radiación UVB son causante de cataratas, existiendo otros factores principalmente la edad. Sin embargo, al ser un factor desencadenante es necesario resaltar la importancia de la protección a este tipo de radiaciones, ya que las cataratas son la principal causa de ceguera en el mundo (Cañarte, 2010).

El Pterigio, es una de las afecciones más frecuentes y prevalentes en zonas de altitudes elevadas y cercanas al Ecuador, debido a que en estos lugares la exposición a los rayos ultravioleta es superior. Es necesario la operación para evitar que avance la gravedad de esta afección de lo contrario podría llegar a producir ceguera, sin embargo no todo se resuelve con la operación ya que podría ocasionar recidiva (Andre et al., 2015).

1.6.4 Sistema Inmunológico

Es el sistema de defensa del organismo, el cual nos protege de infecciones, el cáncer y sobre todo reconoce y responde de forma eficaz ante microorganismos invasores o la aparición de tumores. De acuerdo a estudios se revela que existe un efecto inmunosupresor sistemático debido a la exposición a la radiación ultravioleta, tanto a dosis bajas como altas.

En consecuencia, la constante exposición a radiaciones ultravioleta, aumentan el riesgo de infecciones bacterianas, parasitarias, víricas o fúngicas, según experimentos realizados en animales. De la misma manera puede reducir la eficacia de vacunas, debido a que muchas enfermedades que se pueden prevenir con vacunas son extremadamente infecciosas y cualquier factor que disminuya la eficacia de vacunas, puede tener un gran impacto en la salud (OMS, 2003).

Las personas que han sido tratadas con fármacos inmunosupresores presentan un mayor riesgo de generar carcinoma de células escamosas en población normal.

1.6.5 Cáncer de piel

El cáncer de piel es la neoplasia maligna más común en el mundo, cuya incidencia va en aumento en los últimos años. El riesgo de desarrollar cáncer de piel surge de una combinación de factores genéticos y ambientales y la causa más común es la exposición constante y

prolongada a la luz ultravioleta (UV), ya que se asocia de forma directa en la aparición de tumores no melanoma, no relacionándose de la misma manera en el melanoma. En el caso de los tumores de piel no melanoma la radiación UV, es responsable de generar mutaciones en genes como el p53, siendo la acumulación de las mutaciones en este gen, el inicio del proceso tumoral de piel (Morales y López, 2006).

Los factores genéticos para el desarrollo de cáncer de piel están relacionados con el fenotipo del color de piel, siendo los tipos de piel de menor número, de acuerdo a la escala de Fitzpatrick, los más susceptibles a las quemaduras solares y sobre todo tienen mayor riesgo de contraer cáncer de piel (Young et al., 2017, pp.S100-S109).

Tabla 1-1: Fitzpatrick tipo de piel y respuesta a la radiación ultravioleta

Tipo de piel	Color de la piel (protegido)	Fenotipo	Susceptibilidad a las quemaduras solares	1 MED (como SED)	Capacidad de bronceado	Susceptibilidad al cáncer de piel
I	Blanco 	Cabello muy claro, blanco pálido, de color claro o rojo, a menudo con pecas.	Muy fácilmente	2-3	Nunca se broncea	Muy alto
II	Blanco 	Piel blanca y clara, pelo claro y ojos azules o marrones. Algunos pueden tener cabello oscuro.	Fácilmente	3-4	Bronceado mínimamente	Muy alto
III	Blanco 	Marrón claro, piel aceituna clara, pelo oscuro blanco y ojos marrones o verdes.	Moderadamente	4-5	Bronceado promedio	Alto
IV	Aceituna 	Marrón moderado, ojos marrones y cabello oscuro	De vez en cuando	5-6	Bronceado fácilmente	Moderar
V	marrón 	Marrón oscuro, ojos marrones y pelo oscuro.	Raramente	8-12	Bronceado fácil y sustancialmente	Bajo

VI	Negro / marrón oscuro 	Muy pigmentada de color marrón oscuro a marrón negro, ojos negros y cabello negro.	Nunca / rara vez	16-24	Bronceado fácilmente y profusamente	Bajo
-----------	--	--	---------------------	-------	--	------

MED , dosis mínima eritemal; *SED* , dosis estándar de eritema.

Fuente: (Young et al., 2017)

Este sistema proporciona una clasificación numérica, basada en la reacción de la piel, expuesta a los rayos UVA (bronceado) y a la UVB (quemadura).

Además de este factor genético, existen otros como un diagnóstico previo, antecedentes familiares de cáncer de piel, especialmente melanoma (Watson et al., 2016, pp.241-254).

Para fines de estudio el cáncer de piel se ha dividido en dos grupos:

No melanoma o cáncer de piel no melánico (CPNM): aparece frecuentemente en las partes del cuerpo que están más expuestas a la radiación como la cara, orejas, cuello y antebrazos. Dentro de este grupo tenemos principalmente al Carcinoma Basocelular (CBC) y al Carcinoma espinocelular (CEC). Estos tipos de cáncer raramente son mortales sin embargo llegan a ser desfigurantes (OMS, 2003).

Carcinoma Basocelular (CBC): es el más común de todos, las células presentan una morfología muy parecida al estrato basal de la epidermis, por eso su nombre. Se caracteriza por ser muy invasivos localmente, de crecimiento lento y con un escaso riesgo de producir metástasis, sin embargo si no es tratado oportunamente y de forma adecuada en el primer brote pueden provocar, destrucciones de la cara e incluso hay una tendencia a la recidiva (Gutiérrez, 2003, pp.166-171).



Figura 3-1: Carcinoma de células basales

Fuente: (OMS, 2003)

Carcinoma Espinocelular (CEC): este tipo de cáncer se desarrolla en la cabeza, el cuello y extremidades, lugares que están expuestos al sol por tiempos prolongados, se presenta en forma de costra abultada, ésta puede crecer de forma rápida llegando a ulcerarse y supurarse.

Es necesario tratar este tipo de tumores debido a que tiene un mayor potencial de generar invasión local y metástasis (Diaz et al., 1995, pp.83-92).



Figura 4-1: carcinoma de células escamosas
Fuente: (OMS, 2003)

Melanoma maligno (MM): Es menos frecuente que CPNM, sin embargo, es la principal causa de muertes de cáncer de piel. En los últimos años la incidencia de MM ha ido en ascenso, mientras disminuye la latitud, por lo que en Australia las tasas anuales de hombres y mujeres son, 10 y 20 veces superiores a las registradas en Europa.

Las personas que están más propensas a contraer los MM, son las de piel clara, ojos azules, cabello rubio o rojo. El factor de riesgo del melanoma maligno, en poblaciones de piel clara es la presencia de gran número de nevos (lunares) atípicos. Otro factor importante es la exposición intermitente a la radiación ultravioleta solar (OMS, 2003).



Figura 5-1: Melanoma Maligno
Fuente: (OMS, 2003)

1.7 Fotoprotección

El objetivo de la fotoprotección es prevenir el daño tanto en la piel como en nuestra salud como resultado de la exposición a la radiación ultravioleta. Para ello la piel tiene mecanismos naturales de defensa o también denominada la fotoprotección intrínseca, para protegerse de

esta agresión, su eficacia es variable según los individuos e insuficiente en aquellos de fototipos claro. Otra forma de protección es la exógena, para lo cual se ha desarrollado estrategias de protección, basadas en reducir el tiempo de exposición solar, sobre todo en horas del mediodía, cubrirse con ropa, sombreros adecuados, llevar gafas y la aplicación de fotoprotectores (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

1.7.1 Fotoprotección intrínseca:

El mecanismo de defensa frente a los rayos UV, que posee el organismo, es el engrosamiento de la capa córnea, la producción de melanina, activación de moléculas antioxidantes, sistemas de reparación de ADN y síntesis de citocinas. Sin embargo, no es tan efectiva en los fototipo cutáneos claros.

La melanina protege de los daños solares, a través de la absorción directa de fotones de radiación ultravioleta, así como de las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas en la interacción de los fotones con lípidos de las membranas y otros cromóforos de la célula. En las células la melanina se distribuye sobre el núcleo y forma un melanic cap, de esta manera protege al núcleo de la radiación ultra violeta (Gilchrest et al., 1999, pp.1341-1348). Esta pigmentación protege bien en un rango de radiación de 305-365 nm, la protección disminuye a una longitud de 295 nm y es mínima a 315 nm (Kollias et al., 1996).

El estrés oxidativo que se produce por la luz solar, es combatido por el sistema de antioxidantes que posee la piel, actuando principalmente a nivel celular son los antioxidantes enzimáticos, dentro de los cuales se incluye la reductasa y el glutatión peroxidasa. La actividad de estas enzimas es mayor en la epidermis en relación con la dermis, especialmente la catalasa. También existe un sistema no enzimático, los cuales son de bajo peso molecular, entre ellos en el medio líquido está el ácido L-ascórbico (predominante en la piel), en el compartimento celular el glutatión, en las membranas la vitamina E y en la mitocondria el ubiquinol (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

1.7.2 Fotorprotección Exógena:

este tipo de protección incluye todos los métodos y estrategias que las personas utilizan para disminuir los efectos perjudiciales de las radiaciones sobre la piel. Incluye actividades como

evitar la exposición al sol, llevar gorros, gafas, ropas adecuadas e incluso la ingestión de sustancias desatinadas para este fin.

La fotoprotección ultra violeta proporcionada por las prendas de vestir depende del color, tipo de tejido, diseño, de modo que el color oscuro aumenta de 3 a 5 veces el grado de protección de un tejido (Hoffmann , et al., 2001, pp.1089-1094).

Tipo de tejido	Algodón, viscosa, rayón y lino tienen menos FPU que nailon, lana, seda y poliéster
Porosidad, peso y grosor	El FPU aumenta cuanto menores son los espacios entre los hilos y cuanto mayor es el peso y el grosor del tejido
Color	Los colores oscuros poseen mayor FPU
Estiramiento	El FPU disminuye con el estiramiento del tejido
Humedad	El FPU disminuye cuando el algodón está húmedo
Lavado	El lavado aumenta el FPU en el algodón

FPU: factor de protección ultravioleta.
Modificada de Hoffman et al⁴.

Figura 6-1: Resumen de los factores que afectan significativamente el factor de protección ultravioleta de los tejidos.

Fuente: (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

Tanto gorras y sombreros proporcionan buena pantalla física para el rostro y el cuello. Mientras que las gafas ayudan a cuidar los ojos y las áreas perioculares de los efectos perjudiciales de la radiación ultravioleta. La American Academy of Ophthalmology informa que las gafas de sol protegen en un 99% de las radiaciones UVA Y UVB, además la capacidad de protección se correlaciona con el color de la lente (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

1.8 FOTOPROTECTORES

Con el fin de prevenir los efectos nocivos de los rayos solares se utiliza fotoprotectores, que son productos cosméticos que aplicados en la piel cumplen con los siguientes objetivos: (Esteva, 2005)

- Dispersión de las radiaciones
- Evitar el eritema solar
- Reducir el riesgo de fotosensibilizaciones, fotodermatitis
- Disminuir el riesgo de cáncer cutáneo

- Inactivación o destrucción de radicales libres y las ROS

Un filtro solar debe cumplir con las siguientes condiciones:

- Seguridad. No debe producir alergia o ser tóxico
- Eficacia
- Versatilidad

No deben manchar, ser cosméticamente aceptables y permitir su formulación en diferentes excipientes (Esteva, 2005).

Los fotoprotectores o filtros solares pueden ser de varios tipos: físicos, químicos y biológicos.

1.8.1 Filtros físicos o inorgánicos

Este tipo de filtros crean, una pantalla sobre la piel la cual refleja o dispersa la radiación ultravioleta. Son pigmentos minerales, opacos a la luz lo que produce el efecto de pantalla.

Están formados por polvos inertes constituidos por partículas pequeñas de entre 180-250 nm de dióxido de titanio, óxido de hierro, óxido de cinc, óxido de magnesio, talco o mica. La capacidad de estos minerales para bloquear la radiación UV, está determinada por diferentes propiedades físicas como tamaño de partícula, índice de refringencia y la dispersión de acuerdo al espesor de la película (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

Este tipo de filtros presenta un rango amplio de protección ultravioleta, sin embargo, posee ciertas desventajas como la de otorgar a la piel un aspecto blanquecino haciéndolo poco estético, para corregir este problema se podría disminuir su concentración, pero se estaría disminuyendo el factor de protección. (Luengo, 2015, pp.29-31).

Otra desventaja es que favorece la comedogénesis, que es una fase inicial comprendida por el acné, originada por la presencia de comedones, que son lesiones formadas en la piel como resultado de la acumulación de grasa, células epiteliales y polvo, esto en conjunto genera la obstrucción y distensión de los canales excretorios, de las glándulas sebáceas (Piquero, 2015).

1.8.2 Filtros químicos u orgánicos

Son sustancias de síntesis formadas por compuestos aromáticos conjugados con grupos carbonilo, los cuales absorben la energía de los fotones de la radiación ultravioleta, considerándose cromóforos exógenos.

Según su espectro de absorción se divide en:

Fotoprotectores UVA: la mayoría de filtros también absorben parte del UVB, está formado por las benzofenonas, ácido tereftalidenodicalcanfor sulfónico. La benzofenona más utilizada

es la oxibenzona y absorbe los UVA Y UVB cortos. Sin embargo, los derivados del alcanfor no están autorizados en EEUU, pero sí en Europa (Vallejo et al., 2013 p.1).

Fotoprotectores UVB: Incluyen compuestos como el ácido paraaminobenzoico (PABA), sus ésteres (padimato A y O), cinamatos, salicilatos y octilmetoxicinamato (OMC). Todos estos bloquean alrededor del 90% de las radiaciones UVB, en su espectro completo, ofreciendo protección frente al eritema y quemaduras inducidas por la luz solar (Vallejo et al., 2013 p.1).

El PABA y sus derivados a pesar de ser los que se emplearon inicialmente, su uso no era seguro debido a las reacciones cutáneas que provocaba por lo que su uso fue limitado. Mientras que los salicilatos tienen un perfil de seguridad excelente, aunque absorben menos radiación UVB (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

El Octilmetilcinamato (OMC), ha demostrado ser eficaz en la prevención de quemaduras, pero su eficacia frente al melanoma continúa bajo. Además, estudios han demostrado que el OMC y las benzofenonas, se comporta como disruptores endócrinos, alterando el normal funcionamiento de los organismos. Dentro de las actividades hormonales que afecta es la estrogénica, antiandrogénica, antiprogesterona, y antitiroidea (Lorigo et al., 2018, pp.46-58).

1.8.3 Filtros biológicos

Son los antioxidantes que no permiten la formación de radicales libres, potenciando así el sistema inmunológico reduciendo el estrés oxidativo generado por radiación UV. Las sustancias empleadas con frecuencia son las vitaminas E (α -tocoferol) que son las más utilizadas (acetato o palmitato), B5 (pantenol) A (β -carotenos). Investigaciones han demostrado que estas vitaminas poseen actividad antioxidante, actúa contra el cáncer de piel, envejecimiento cutáneo, producido por exposición a la luz solar. Los antioxidantes contrarrestan los efectos de la radiación, no influyen directamente en el factor de protección solar. Productos que reúnen la combinación de filtros UVA, UVB y antioxidantes tienen un amplio espectro de fotoprotección y elevada eficacia (Burnett et al., 2012, p.244).

1.9 Factor de protección solar (FPS)

El factor de protección solar es el índice que nos indica el tiempo que podemos permanecer bajo el sol, sin que nos cause quemaduras (Esteva, 2005).

El FPS, se valora dividiendo entre la dosis eritematosa mínima (DEM), de la piel protegida con una cantidad de 2 mg/cm² de fotoprotector y sin fotoprotector, calculado a las 24 horas

de irradiación. Cuanto más alto sea el factor de protección solar (FPS) mayor será la protección frente a la radiación UV. El cálculo del FPS, es el método utilizado para determinar la eficacia del protector solar (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

Se ha determinado que un Factor de protección solar de 15 bloquea un 93 % aproximadamente de las radiaciones UVB, Un factor de protección solar de 30 bloquea el 97% y un factor de protección solar de 50 bloquea el 99%. La diferencia entre estos porcentajes puede ser mínima, pero si el fototipo de piel es sensible o se tienen antecedentes de cáncer de piel, esos porcentajes harán la diferencia. Además, es necesario la aplicación del fotoprotector cada dos horas, para evitar que se pierda su eficacia (The Skin Cancer Foundation, 2017).

Tabla 2-1: Categoría de FPS según COLIPA

Categoría	Factor de Protección Solar (FPS)
Bajo	2-4-6
Medio	8-10-12
Alto	15-20-25
Muy alto	30-40-50
Ultra	Superior a 50

Fuente: (Batlle, 2005)

Existen diferentes métodos de determinación del factor de protección, sin embargo, el método COLIPA es el más utilizado.

Niveles de sensibilidad al sol	Protección natural en min.	Niveles de intensidad solar			
		Baja	Moderada	Alta	Muy Alta
La piel de los niños es extremadamente propensa al eritema solar	5	SPF 25	SPF 50+	SPF 50+	SPF 50+
1. Extremadamente sensible: piel blanca, pecas, cabello pelirrojo, muy propenso a eritemas solares	5-10	SPF 20-30	SPF 50-50+	SPF 50+	SPF 50+
2. Muy sensible: piel blanca, cabello rubio	10-20	SPF 20	SPF 30-50+	SPF 30-50+	SPF 50+
3. Moderadamente sensible: piel blanca, cabello oscuro o castaño, eritemas solares infrecuentes	20-30	SPF 20	SPF 20-30	SPF 30-50+	SPF 50+
4. Menos sensible: piel oscura, cabello oscuro casi nunca eritemas solares	30-40	-	SPF 20	SPF 30	SPF 30-50+

FPS multiplicado por la duración de la protección natural de la piel = duración máxima de la exposición al sol sin eritema.

Figura 7-1: Niveles de intensidad solar y el FPS

Fuente: (Eucerin, 2018)

1.10 Seguridad de Fotoprotectores

Los fotoprotectores son utilizados por millones de personas, aplicándolos sobre una gran parte de la superficie cutánea, varias veces al día, por tanto, deben ser eficaces y, ante todo, seguros para la salud. Es por ello que autoridades reguladoras nacionales e internacionales han determinado una serie de metodologías de estudio para avalar tanto seguridad y eficacia de estos productos. Como se puede observar en el siguiente cuadro:

<i>Prueba</i>	<i>Finalidad</i>
Toxicidad oral aguda y cutánea	Toxicidad de una dosis única oral y tópica
Irritación ocular y cutánea	Potencial irritativo
Fotoirritación	Potencial de producir irritación tras una dosis o dosis repetidas en presencia y ausencia de luz solar
Sensibilización y fotosensibilización	Potencial de una sustancia de producir alergia en presencia y ausencia de luz solar
Toxicidad subcrónica tópica y oral	Toxicidad de dosis diarias repetidas tópicas y orales
Teratogenicidad	Efectos adversos en el embrión o en el feto
Toxicidad peri o posnatal y fertilidad	Efectos adversos en los órganos reproductivos femeninos y masculinos. Efecto durante el embarazo avanzado o la lactancia
Toxicidad genética <i>in vitro</i>	Potencial de afectar el material genético
Fotogenotoxicidad <i>in vitro</i>	Potencial de afectar el material genético bajo irradiación UV
Toxicidad genética <i>in vivo</i>	Potencial de afectar el material genético <i>in vivo</i>
Toxicidad crónica, tópica u oral	Efectos adversos tras administración crónica (> 6 meses)
Carcinogenicidad tópica	Potencial de producir tumores
Penetración <i>in vitro</i>	Potencial de penetrar en la piel
Penetración <i>in vivo</i>	Penetración dentro de los organismos mamíferos
Farmacocinética <i>in vivo</i> y ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
Fotocarcinogenicidad	Potencial de aumentar la producción de tumores inducidos por la radiación UV
Seguridad en seres humanos	Sensibilización, irritación, fotoirritación, fotosensibilización

ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción; UV: ultravioleta.
Tomada de SCCNFP, 1999; FDA, 1999; FDA, 2000; MHW, 1991; Yakuji Nippo, 1995⁵⁷.

Figura 8-1: Dossier Internacional de Seguridad de los fotoprotectores de acuerdo con los requerimientos de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón

Fuente: (Gilaberte et al., 2003, pp.271-292).

1.11 Metabolitos con actividad fotoprotectora

Con las tasas de cáncer en aumento en los últimos años y un gran interés en prevenir los efectos de fotoenvejecimiento, se ha estado investigando nuevas moléculas especialmente de compuestos de plantas, con potencial para defender contra el daño UV, sustancias como las polifenólicas, flavonas, flavonoides, taninos y fracciones de lípidos de plantas (Rabinovich y Kazlouskaya, 2018).

Los ácidos fenólicos naturales, abarca aproximadamente 8000 compuestos de origen natural, todos poseen una característica en común, un fenol (un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo), son metabolitos secundarios de las plantas y los encontramos

comúnmente en hierbas y ciertas frutas verdes, granos, té, granos de café, granos de propóleo y vino tinto constituyendo así una parte integral de la dieta humana. Contienen dos marcos distintivos de carbono constitutivos (las estructuras del ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico) (Radice et al., 2016, pp.144-162).

Los polifenoles de peso molecular alto, comúnmente conocidos como taninos, son compuestos poliméricos, se divide en dos grupos: condensados (polímeros de catequinas o epicatequinas) e hidrolizables (polímeros de ácidos gálico o elágico), Los compuestos fenólicos particularmente los polifenoles tiene una amplia gama de propiedades biológicas para el ser humano incluyendo las antivirales, antidepresivos, hepatoprotector, antiinflamatorio, anticancerígeno. Además, son poderosos antioxidantes (Svobodová, et al., 2003, pp.137-145).

Flavonoides, son un grupo de bajo peso molecular (quercetina, luteolina, catequinas). Estos flavonoides, son mejores antioxidantes que la vitamina C, vitamina E y β -caroteno, por lo tanto, resultan ser beneficiosos para prevenir la generación de radicales libres y peroxidación de lípidos inducidos por radiación ultravioleta e involucrados en el fotoenvejecimiento y el cáncer de piel. Además, inhiben las actividades de muchas enzimas, incluyendo lipoxigenasa, ciclooxigenasa, monooxigenasas NADH-oxidasa (Radice et al., 2016, pp.144-162).

Los flavonoides están combinados generalmente con azúcares formando glicósidos, aunque también se encuentran frecuentemente como agliconas libres. Los glicósidos son muy solubles en solventes polares, lo que les hace menos reactivos frente a radicales libres, que su aglicona o flavonoide correspondiente (Kumar y Pandey, 2013, p.16).

Los niveles de flavonoides de cada planta está determinada genéticamente, sin embargo, están influenciadas por varios factores como el clima, estación, composición del suelo, etapa de madurez de la planta (Cefali, et al, 2016, pp.1-8).

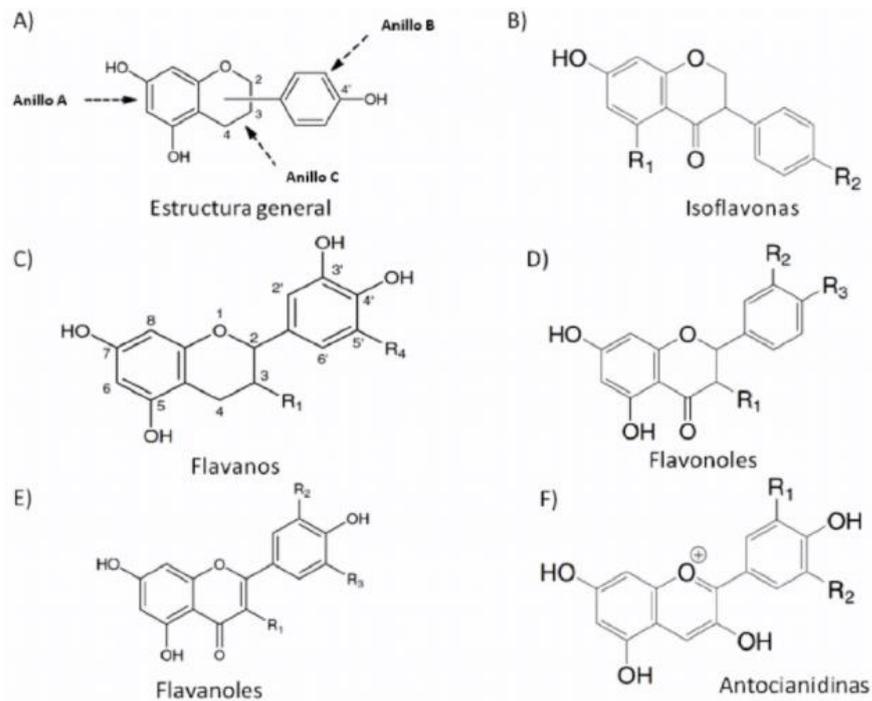


Figura 9-1: Estructura de los principales Flavonoides

Fuente: (Limón, et al., 2010)

La quercetina, (3, 5, 7, 3', 4'-pentahidroxiflavón), es uno de los flavonoides naturales más abundantes y se encuentran presentes en frutas y verduras (uvas, manzanas, tomates, limones, lechuga, tomate, cebolla, brócoli, semillas de algodón, etc.), bebidas (vino tinto, té), varias plantas y propóleo de colmenas de abejas. Actúan como un poderoso antioxidante y quelante de iones metálicos. Debido a su estructura, ya que presenta un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo -OH, en posición 3 del anillo C, dicha estructura hace que ejecute una acción inhibitoria frente a los radicales hidroxilo y superóxido, los cuales son los inductores principales de la peroxidación lipídica. Se cree que la quercetina es capaz de prevenir los problemas producidos por el efecto de la radiación UV (Svobodová, et al., 2003, pp.137-145).

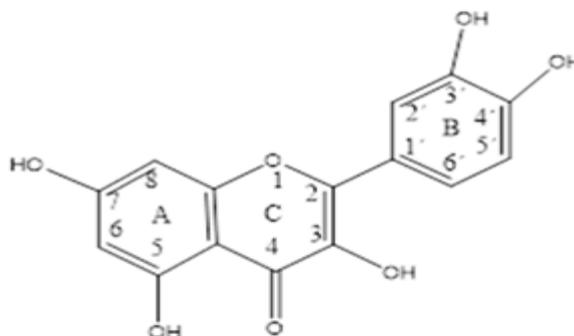


Figura 10-1: Estructura de la Quercetina

Fuente: (Markel et al., 2017, p.1)

Mecanismo de acción frente a la radiación UV

Existen varios mecanismos por los cuales una planta puede actuar como un agente fotoprotector. La absorción de la energía UV por el fotón y posterior emisión de energía menos dañina es uno de los mecanismos. Los extractos de plantas presentan una mezcla de moléculas que son capaces de absorber la luz visible, así como la luz UV de diferentes longitudes de onda (Rabinovich y Kazlouskaya, 2018).

1.12 Estándar McFarland

Es un estándar que se utiliza como referencia para suspensiones bacteriológicas, con el objetivo de saber el número de bacterias por mililitro de solución o bien en número de unidades formadoras de colonia (UFC) de acuerdo a la escala que va de 0.5-10 (Becton, 2005).

Este estándar se compone de una mezcla de ácido sulfúrico, y una solución acuosa de cloruro de bario, dando como resultado de esta mezcla, un precipitado de sulfato de bario (Rojas, 2011).

Los estándares pueden compararse visualmente con suspensiones de bacterias en suero fisiológico estéril o en caldos. La ventaja es que si la suspensión no es lo suficientemente turbia se puede adicionar más bacterias y por el contrario si es demasiado turbia, agregarle más diluyente. Otra ventaja es que no se necesitan equipos especiales para estimar el número de bacterias, ya que se puede utilizar un patrón de líneas horizontales para ayudar a una mejor visualización en la comparación del estándar y la suspensión bacteriana (Rojas, 2011).



Figura 11-1: Comparación del estándar McFarland 0,5 y la suspensión bacteriana

Fuente: (Ajello et al., 2004)

1.13 *Escherichia coli*

Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

TAXONOMÍA	
REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	Gammaproteobacteria
ORDEN	Enterobacteriales
FAMILIA	Enterobacteriaceae
GÉNERO	<i>Escherichia</i>
ESPECIE	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: (Ramírez et al., 2010, pp. 1-14)

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo de características móviles, por lo que posee flagelos peritricos, miden alrededor de 0.5 micras de ancho por 3 micras de largo. Son microorganismos que reducen nitratos a nitritos y producen vitamina B y K (Ramírez et al., 2010, pp. 1-14).

Pertencen al grupo de bacterias que se encuentran localizadas en el intestino de humanos y animales, sin embargo, algunas cepas de *E. coli* producen toxinas que causan graves cuadros gastrointestinales en el ser humano (Ramírez et al., 2010, pp. 1-14).

Durante mucho tiempo se ha utilizado esta bacteria como modelo celular para realizar varios estudios y ensayos *in vitro*, debido a que su cepa es manejable, rápidamente reproducible, fácilmente identificable (Martínez, 2014).

1.14 ATCC

ATCC (American Type Culture Collection), es una organización global de recursos y estándares de, materiales biológicos. Su misión consiste en la adquisición, autenticación, producción, preservación, desarrollo y distribución de líneas celulares, microorganismos de referencia estándar y otros materiales. ATCC es pionero en desarrollar productos, estándares y servicios de calidad certificada para respaldar la investigación científica (ATCC, 2016).

Los microorganismos con código ATCC son de referencia estándar, debidamente procesadas, mantenidas y subcultivadas. microorganismos puros empleados en laboratorios de

investigación y desarrollo para la validación de métodos, pruebas confirmatorias, control de calidad de reactivos y medios de cultivo (ATCC, 2016).

1.15 Muerte celular inducida

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

Como se mencionó existen factores o estímulos externos que inducen muerte celular, uno de estos factores es la radiación UVB, ya que ésta causa daño y posteriormente lisis celular, motivo por el cual se utilizará para determinar la capacidad fotoprotectora de los extractos (Medrán, 2008).

1.16 Ensayo de Genotoxicidad

La seguridad de los productos que van a entrar en contacto con el ser vivo, es indispensable, para prevenir riesgos que pueden expresarse a corto, mediano o largo plazo.

La genotoxicidad, es la capacidad de un agente de inducir daño en el material genético, dando lugar a efectos biológicos adversos, no solo al ADN, también a los componentes celulares que estén relacionados con el comportamiento y funcionalidad de los cromosomas dentro de la célula (Salas, 2014, p.11).

Varias pruebas *in vitro* están disponibles en diferentes etapas de desarrollo y aceptación como la prueba de micronúcleos.

1.16.1 Prueba de Micronúcleos (PMN)

El PMN es un importante biomarcador *in vivo* e *in vitro*, ampliamente utilizado en la epidemiología molecular y la citogenética. El término micronúcleo (MN), también conocido como cuerpos Howell-Jolly, fue introducido en 1951 y está relacionado con fragmentos acéntricos expulsados del núcleo principal en las últimas etapas de anafase. Los MN se

pueden formar a través de dos mecanismos: ruptura cromosómica (clastogénesis) o ruptura del aparato mitótico (Anegensis) (Araldi, et al., 2015, pp.74-82).

Las células mitóticas meristemáticas de las raíces de las plantas son materiales citogenéticos apropiados y eficientes para la detección de clastogenicidad de los contaminantes ambientales. Entre los diversos valores citológicos en estas células presentan división rápida, como las aberraciones cromosómicas y cromáticas, los intercambios de cromátidas hermanas y los micronúcleos, el indicador más eficaz y más simple de daño citológico es la formación de micronúcleos. *Vicia faba* se ha utilizado para evaluar las aberraciones cromosómicas desde principios de la década de 1920, además, en la detección de micronúcleos en las puntas de la raíz de *Vicia* ha sido recientemente desarrollado para evaluar la genotoxicidad en diferentes matrices (Hajjouji et al., 2007, pp. 25-31).

Por lo tanto, el ensayo de micronúcleos es muy utilizado para evaluar la capacidad que tiene una sustancia para romper los cromosomas (clastogenicidad) o para afectar el desarrollo de placa metafásica y/o huso mitótico, ambos eventos son capaces de desencadenar en una distribución desigual de cromosomas, durante la división celular. Este ensayo genera resultados con un apoyo estadístico importante, por lo cual es ampliamente utilizado como herramienta de selección para determinar la seguridad de gran cantidad de sustancias y clasificarlas como cancerígenos y no cancerígenos (Alborghetti et al., 2015, pp.21-26).

1.17 Ensayo de Irritación ocular

La Toxicología es una de las ramas de la ciencia que trabaja por el desarrollo de nuevos métodos y técnicas encaminadas a sustituir métodos tradicionales por alternativos, aplicando el principio de las 3 R en los animales de experimentación, que se refieren a reemplazar los animales de experimentación, por otros métodos que no impliquen su uso, reducir su número cuando sea necesario utilizarlos y refinar las técnicas para armonizar su sufrimiento (Martínez-Hidalgo, 2007, pp.41-52).

Uno de estos métodos tradicionales es el conocido test de irritación ocular o test de Draize, el cual se llevaba a cabo a pesar del terrible sufrimiento que sufría el conejo. En la actualidad el ensayo alternativo que se está aplicando es el HET-CAM de la membrana corioalantoidea (MCA) del huevo de gallina, conocido por las siglas HET-CAM de su nombre en inglés (hen's egg test on chorioallantoic membrane) es una prueba que permite estimar *in vitro* el potencial de irritación ocular de sustancias y productos terminados. Consiste en el uso de un colorante y la lectura espectrofotométrica de la muestra. A partir del establecimiento de estos protocolos, el método del HET-CAM como sustitutivo del test de Draize ha sido uno de los

más analizados, ha estado incluido en varios estudios de validación realizados y se le considera uno de los más prometedores para dicho fin. Además de lo anterior, es un método reproducible y sencillo, que no requiere de equipamiento especial, todo lo cual lo convierte en un procedimiento muy utilizado para la evaluación toxicológica preliminar de diferentes productos sobre todo en cosméticos (Murillo et al., 2003, pp. 187-192).

1.18 Lippia

El género *Lippia* perteneciente a la familia de las Verbenaceae, incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños, los cuales se distribuyen principalmente en países de América central y del sur. Existen 60 taxones infraespecíficos, el número mucho más alto de especies atribuidos a este género, el cual se dio probablemente por la inclusión taxonómica de varios taxones con algunas características comunes a *Lippia*. Es así como Moldenke, luego de una comparación a las descripciones genéricas dadas a este género concluyó que presumiblemente todos los autores incluyeron *Acantholippia*, *Aloysia* y *Phyla* en su concepto de *Lippia*, debido a que estos géneros están estrechamente relacionados. (Pascual et al., 2001, pp.201-214)

La mayoría de especies de *Lippia* se utilizan tradicionalmente como remedios gastrointestinales, respiratorios e incluso han demostrado tener actividad antimalárica, antiviral y citostática. Este género presenta principalmente compuestos fenólicos (flavonoides) como principios activos. En general el género aparenta presentar un perfil de composición química, actividades farmacológicas y usos populares, siendo en su mayoría las hojas, o partes aéreas y flores las partes de la planta más utilizadas. (Pascual et al., 2001, pp.201-214)

Cabe destacar que las hojas son la parte más utilizada de la planta ya que en algunos casos es utilizada como condimento en preparaciones alimenticias. Por otra parte, un estudio realizado por Kinghorn y sus colegas ha demostrado que tras el aislamiento del componente no tóxico de las hojas de *Lippia dulcis* (hernandulcina), demostró que era 1000 veces más dulce que la sacarosa (Pascual et al., 2001, pp.201-214).

1.19 *Lippia scorodonioides*



Figura 12-1: *Lippia scorodonioides*

Fuente: (Cerón y Paredes, 2015)



Figura 13-1: *Lippia scorodonioides*

Fuente: Guaita Mayra, 2018

Tabla 4-1: Clasificación taxonómica de *Lippia scorodonioides*

TAXONOMÍA	
REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Verbenaceae
GÉNERO	<i>Lippia</i>
ESPECIE	<i>Lippia scorodonioides</i>

Fuente: (ARCSA, 2015)

1.19.1 Nombres vulgares

Cardíaca, cedroncillo (ARCSA, 2015)

1.19.2 Nombre científico

Lippia scorodonioides Kunth = *Aloysia scorodonioides* (Kunth) Cham. (Klitgaard *et al.*, 2018)

1.19.3 Origen

América del Sur (Argentina, Chile, Uruguay, Ecuador y Perú). (Klitgaard *et al.*, 2018)

1.19.4 Usos

Es utilizada frecuentemente para tratar problemas de nervios y del corazón. Además, tiene propiedades antisépticas. (Correa , 2016)

1.19.5 Características

El género se caracteriza por ser Arbustos muy ramificados, aromáticos, muy ricos en aceites esenciales. La especie *scorodonioides* posee ramas con entrenudos de 4-5 cm, glabrescentes. Hojas con pecíolo de 4-6 mm, cara adaxial rugosa, cara abaxial densamente tomentosa-pubérula. Pedúnculos de 2-3.5 cm. Espigas simples o ramificadas, de hasta 15 cm, raquis pubescente, brácteas menores que el cáliz, angostamente elípticas. Flores blancas; cáliz de 2,5-3,5 mm, densa y largamente incano-hispido; corola de 5 mm, tubo glabro hasta muy pubescente; estambres inclusos; gineceo de 2 mm, ovario glabro. Clusas de 1.5 mm, con escasos pelos en la región apical. (Phil, 2011, pp.2-46)

1.19.6 Recolección

Se realiza preferentemente en verano con las plantas en flor. Además, se pueden arrancar las hojas o tomar las ramas y secarlas para luego guardarlas en un frasco cerrado a la sombra. Los lugares en donde se lo puede recolectar son las planicies arenosas de Pomasqui, San Antonio y Guayllabamba. A una altura de 1800-3336 msnm, por lo que está en mayor contacto con las radiaciones UVB. (Ruales, 2007)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de investigación

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

2.2 Recolección del material vegetal

El material vegetal fue recolectado en la provincia de Pichincha, en el camino Mitad del Mundo, cerca de Perucho, sobre el puente del río Guayllabamba. Estepa espinosa, suelo arenoso-pedregoso con caracoles. A una altura promedio de 2100 m.s.n.m en las siguientes coordenadas 00 ° 05'S 078 ° 20'W (-0.0833300, -78.3333300)

2.3 Acondicionamiento del material vegetal

Luego de la recolección del material vegetal (hojas de *Lippia scorodonoides*), se procedió a su limpieza, lavándolas con agua potable para retirar cualquier material extraño, que pudiese encontrarse en la planta sobre todo en las hojas, luego de ello se separó las mejores hojas, de los tallos, solo aquellas en buen estado, de superficie íntegra y sin ninguna mancha, ya que esta parte del material vegetal, es objeto de nuestro estudio. Posteriormente se colocaron las hojas sobre papel comercio y se las secó en una estufa con ventilación a 40 °C, durante 4 horas. Una vez seco el material vegetal, se procedió a trituirarlo en partículas de 2 y 3mm, utilizando un molino de cuchilla giratoria marca Arthur H, Tomas C.O.

El material seco y trituirado fue guardado en una funda de papel, para evitar que absorba humedad, y protegido de la luz, evitando así todo tipo de contaminación.

2.4 Control de calidad de la materia vegetal

2.4.1 *Determinación del contenido de humedad*

El exceso de agua en el material vegetal, promueve el crecimiento de microorganismos, sobre todo hongos, además desencadena una serie de reacciones como la hidrólisis de los componentes del espécimen, que conlleva al deterioro de la droga. Por lo que existen límites de agua, establecidos por diferentes organizaciones nacionales o internacionales.

El método gravimétrico fue utilizado para la determinación de humedad, éste se basa en la pérdida de masa después de ser desecada en la estufa. Para su determinación se partió de 2 g \pm 0.5 mg, de la planta seca y triturada, fue colocada en una cápsula de porcelana, previamente tarada y desecada a 105°C; seguidamente la muestra se deseco durante 3h a 105°C. Una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la cápsula dentro de una desecadora, hasta que alcanzo la temperatura ambiente y se registró su peso, se colocó nuevamente en la estufa por 1 h, repitiendo el proceso hasta obtener masa constante (Miranda, 2000, pp.34-35). Esta determinación se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados a través de la siguiente fórmula:

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

Donde:

%H= pérdida en peso por desecación

M2 = masa de la cápsula, con la muestra de ensayo (g)

M1 = masa de la cápsula, con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de cápsula vacía

100 factor matemático

2.4.2 *Determinación de cenizas totales*

Este procedimiento se realizó por el método gravimétrico, del residuo obtenido por la incineración de la muestra. Para esta determinación se pesó 2.0 g \pm 0.5 mg del material vegetal seco y triturado, se colocó en un crisol de porcelana, previamente tarada. La muestra fue calentada en un reverbero, hasta total carbonización, seguidamente se incinero la muestra en un horno mufla a 700°C, durante 2 h. Una vez transcurrido el tiempo, el crisol fue retirado de la mufla y se colocó dentro de un desecador, hasta alcanzar temperatura ambiente,

posteriormente se pesó. Este procedimiento se repitió desde la incineración de la muestra, pesando la cápsula cada 30 minutos, hasta alcanzar el peso constante (evitando diferir en más de 0.5 mg por gramo), y el residuo quede de color blanco (Miranda, 2000, pp.32-33). La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresan en la siguiente fórmula:

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

Donde:

%C = porcentaje de cenizas totales, en base hidratada

M = masa del crisol vacío (g)

M1 = masa del crisol con la muestra (g)

M2 = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático.

2.4.3 Determinación de cenizas solubles en agua

Este procedimiento se realizó por determinación gravimétrica. A las cenizas totales obtenidas, fueron añadidos 15 mL de agua destilada, se tapó el crisol y se le colocó en un reverbero hasta que hierva por 5 minutos. Seguidamente se filtró la solución resultante, con la ayuda de un papel filtro libre de impurezas, este papel filtro con el residuo, se trasladó al crisol inicial y se calentó en el reverbero hasta total carbonización (incluido papel filtro), luego se incineró en un horno mufla a 700°C por 2 horas, transcurrido este tiempo, se retiró el crisol del horno mufla y se colocó en un desecador, para enfriarlo hasta alcanzar temperatura constante y se pesó. Este procedimiento repitió a partir de la incineración en la mufla, hasta alcanzar peso constante (Miranda, 2000, p.33). La determinación se realizó por triplicado y los resultados son expresados a través de la siguiente fórmula:

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

Donde:

%C = porcentaje de cenizas solubles en agua, en base hidratada

M2 = masa del crisol con cenizas totales (g)

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

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío (g)

100 = factor matemático.

2.4.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

El procedimiento se realizó por el método gravimétrico. A las cenizas totales obtenidas, se le añadió de 2 a 3 mL de ácido clorhídrico (HCL), al 10%. El crisol tapado con un vidrio reloj fue calentado a baño de agua hirviente por 10 minutos. Trascurrido el tiempo el vidrio reloj se lavó con 5 mL de agua caliente y se unió el contenido al crisol. La solución resultante se filtró utilizando un papel filtro libre de impurezas y se lavó con agua caliente, hasta que al acidularle con ácido nítrico (se añadió dos gotas de nitrato de plata 0,1 M), no mostró presencia de cloruros. El residuo del filtrado conjuntamente con el papel filtro, se colocó en el crisol inicial para seguidamente carbonizarle completamente en un reverbero. Posteriormente se colocó el crisol en el horno mufla a 700°C por un tiempo de 2 horas. Trascurrido el tiempo se retiró el crisol de la mufla y se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente dentro de un desecador (Miranda, 2000, p.33). Este procedimiento se repitió desde la colocación en la mufla hasta alcanzar el peso constante. La determinación se realizó por triplicado y los resultados son expresado utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde:

%B = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

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

M2 = masa del crisol con la ceniza (g)

100 factor matemático.

2.5 Tamizaje Fitoquímico

Una vez realizado el control de calidad del material vegetal (seco y triturado), se procedió a la identificación cualitativa de los componentes químicos, presentes en las hojas de *lippia scorodonioides*, a través de tamizaje fitoquímico o screening, para lo cual se realizaron extracciones sucesivas utilizando solventes de polaridad creciente: éter etílico, etanol, agua respectivamente de acuerdo a lo mencionado en la Farmacognosia y Productos Naturales de Miranda (Miranda, 2000, pp.38-40).

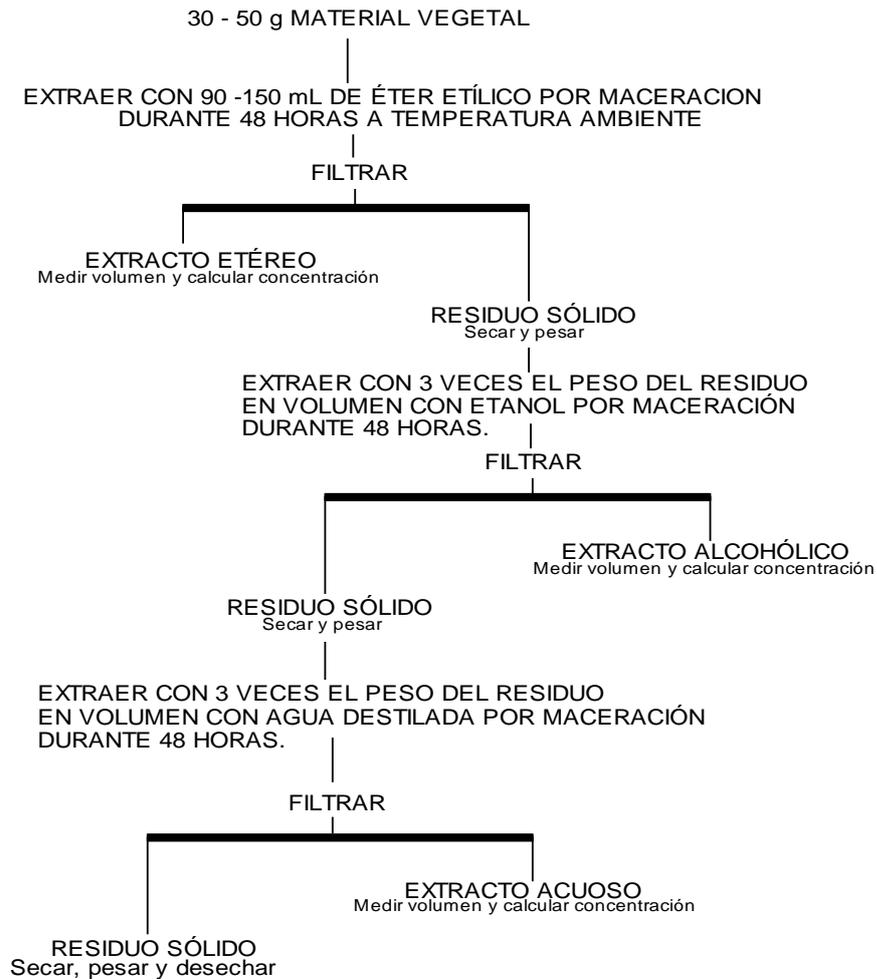


Figura 1-2. Preparación de extractos para realizar el tamizaje fitoquímico
Fuente: Miranda, 2000

Luego de obtener los extractos con los diferentes solventes, se procede a realizar la caracterización de cada extracto por separado, mediante reacciones específicas para cada uno, con la finalidad de identificar metabolitos secundarios propios de las hojas de *Lippia scorodonioides*, a través de reacciones de precipitación y/o coloración.

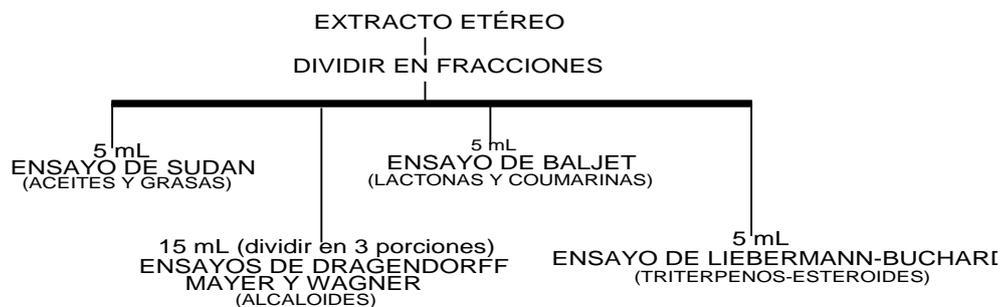


Figura 2-2. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo
Fuente: Miranda, 2000

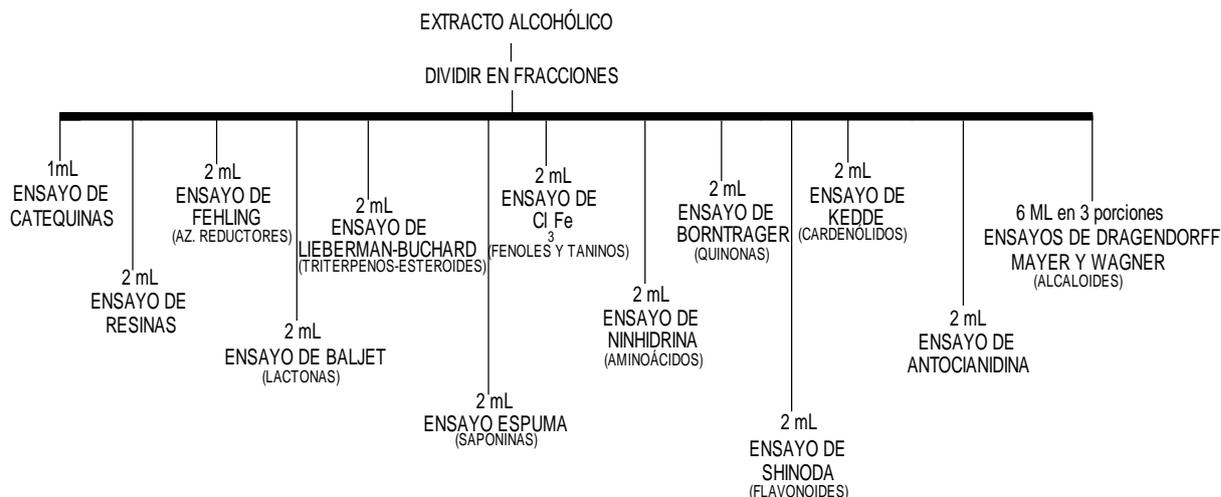


Figura 3-2. Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico

Fuente: Miranda, 2000

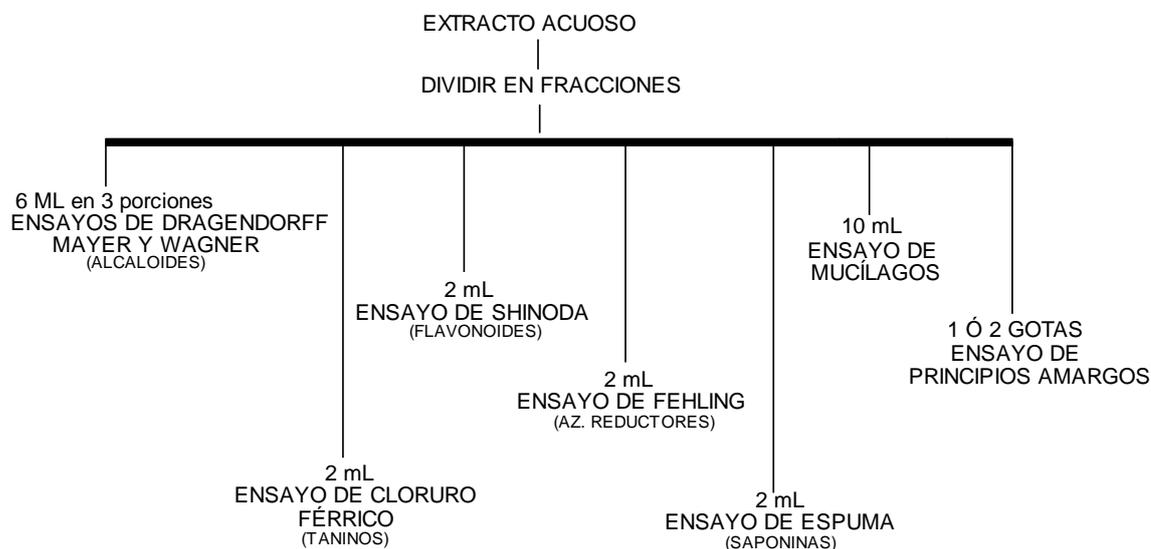


Figura 4-2. Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso

Fuente: Miranda, 2000

2.6 Obtención del Extracto seco de hojas de *Lippia scorodonioides*

2.6.1 Determinación del control de calidad del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*

En un frasco ámbar se colocó 50g de la materia vegetal (seca y triturada), se le añadió 500mL, de solución hidroalcohólica al 70% y se dejó macerar por 3 días en completa oscuridad. Transcurrido este tiempo se filtró el extracto hidroalcohólico, seguidamente se midió el

volumen resultante de la maceración. Con el filtrado obtenido se determinó parámetros organolépticos (olor, color, sabor, aspecto), densidad, índice de refracción, pH y sólidos totales de acuerdo a Ochoa (Ochoa et al., 2013, pp.52-59).

2.6.2 Liofilización

Una vez obtenido y estandarizado el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lippia scorodonioides*, se colocó en un balón esmerilado de 250 mL y se procedió a concentrarlo utilizando un rotavapor BÜCHI 461 a 50°C, y presión reducida, hasta que el etanol fue evaporado por completo. El concentrado obtenido en el balón fue filtrado (Berk, 2018, pp.567-581).

Posteriormente se eliminó el agua contenida en el concentrado, mediante la técnica de liofilización, para la cual, el concentrado fue colocado en un frasco de vidrio y se congeló con un baño de nitrógeno líquido, rápidamente se colocó el frasco en el liofilizador, asegurándose que se forme el vacío y se mantuvo congelado todo el tiempo el concentrado con nitrógeno líquido, para evitar que se funda el extracto (Kinuthia et al., 2016). Al finalizar el procedimiento el frasco que contenía el extracto seco se pesó, para sacar el rendimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\%Rendimiento = \frac{W_L - W_o}{W} \times 100$$

Donde:

WL = Peso del frasco con el liofilizado (g)

Wo = peso del frasco vacío (g)

W = peso de la muestra. (g)

2.7 Determinación de fenoles totales

A partir del extracto seco de hojas de *lippia scorodonioides*, se preparó una solución de 200 ppm, para lo cual se pesó 20 mg de la muestra y se aforo a un balón de 100 mL con etanol al 70%. Posteriormente una alícuota de 250 µL, de la solución obtenida se llevó a un balón de 25 mL. Se agregó 15 mL, de agua destilada y 1.25 mL, de reactivo de Folin –Ciocalteu. La mezcla resultante se homogenizó en vórtex por 30 segundos, luego se dejó reposar por 8

minutos. Transcurrido este tiempo exactamente, se añadió 3.75 mL de solución de carbonato de sodio al 7.5% y se aforó con agua destilada a volumen. Se agitó en vórtex por 5 minutos más, se tapó y se dejó reposar en oscuridad durante dos horas. Una vez cumplido el tiempo exacto, se midió en el espectrofotómetro a 765 nm, usando como blanco una mezcla de agua: etanol al 70% (24.75mL:0.25mL respectivamente) (R.Rover y Marjorie, 2013, pp.366-371).

Como patrón de referencia se utilizó ácido gálico, realizando previamente de una curva de calibración a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, con el procedimiento ya descrito para la muestra. Los resultados obtenidos se expresan en mg de equivalentes de ácido gálico por g de muestra. (mg GA / g de muestra), despejando la concentración en la ecuación de la recta, reemplazando la absorbancia y multiplicando el resultado por el factor de dilución que se empleó. La determinación se realizó por triplicado.

2.8 Determinación de flavonoides totales

A partir del extracto seco de hojas de *lippia scorodonioides*, se preparó una solución de 100 ppm, para lo cual se pesó 10 mg de la muestra y se aforo a un balón de 100 mL con etanol al 70%. Posteriormente una alícuota de 1 mL, de la solución obtenida se llevó a un tubo de ensayo. Se agregó 4 mL, de agua destilada y 0.3 mL, de solución de Nitrato de sodio (NaNO₂) al 5%. La mezcla resultante se dejó reposar por 5 minutos. Transcurrido este tiempo exactamente, se añadió 0.3 mL de cloruro de aluminio (AlCl₃) al 10% (se vortericizó por 1 minuto) y se dejó en reposo nuevamente por 5 minutos (en completa oscuridad). Luego se añadió 2 mL de Hidróxido de sodio (NaOH) 1M, se procedió a vortericizar la mezcla por 15 segundos y se dejó en reposo durante 15 minutos. Una vez cumplido el tiempo exacto, se midió en el espectrofotómetro a 510 nm, usando como blanco una mezcla de agua: etanol al 70% (6.6 mL:1 mL respectivamente) (De Oliveira et al., 2013, pp.102-105).

Como patrón de referencia se utilizó quercetina, realizando previamente de una curva de calibración a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, con el procedimiento ya descrito para la muestra. Los resultados obtenidos se expresan como miligramos equivalentes de quercetina por gramos de extracto seco (mg EQ/g ES), despejando la concentración en la ecuación de la recta, reemplazando la absorbancia y multiplicando el resultado por el factor de dilución que se empleó. La determinación se realizó por triplicado.

2.9 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH*

La actividad antioxidante del extracto de *Lippia scorodonioides* se determinó a través del ensayo del radical estable DPPH* (2,2- difenil-1-picrilhidrazil libre). Este método se sustenta

en la reducción de DPPH en presencia de un antioxidante, un donador de protones (H+), para un no radical (DPPH-H).(Martins et al., 2016,pp.34-39) Dicha reducción se evalúa mediante la disminución de la absorbancia, a una longitud de onda característica, es así como a 517 nm absorbe el radical libre DPPH* y cuando existe una reducción del mismo por acción de un antioxidante, la absorción desaparece.(Mensor et al., 2001,pp.127-130)

Previo a la determinación se preparó la solución del radical DPPH*, para lo cual se pesó 6.9 mg del radical y se aforó a 250 mL con metanol, se agitó y posteriormente se guardó en oscuridad total hasta que se estabilice midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro cada 30 min a 517 nm, hasta la obtención de una absorbancia constante que va de entre 0.6000-0.8000.

Se realizó una curva de calibración con el estándar, el mismo que fue Ácido gálico, para su preparación se pesó 25 mg y se aforó a 25 mL, obteniendo una concentración de 1000 ppm, seguidamente se realizó diluciones para obtener soluciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm

Para preparar la muestra de ensayo, se pesó 25 mg del extracto seco de *Lippia scorodonioides* y se aforó a 25 mL con etanol al 70%, obteniendo una concentración de 1000 ppm. Se procedió de la misma manera que con el estándar. Del cual se preparó diluciones para obtener soluciones de concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm

Una vez obtenidas las soluciones, se colocó 2.9 mL, de solución de DPPH y se añadió 10 µL de la muestra. Incubar a 37°C por 30 min. Se trató de la misma manera por separado cada dilución tanto de la muestra como del estándar.

Una vez transcurrido el tiempo se midió en el espectrofotómetro a 517 nm, en el siguiente orden: Metanol (encerar el equipo), la solución de DPPH*, Blanco (solución de metanol 2.9mL: etanol al 70% 10 µL), muestra de *Lippia scorodonioides*.

Los resultados fueron expresados como (IC50) el valor de concentración del extracto capaz de inhibir el 50% de radicales de DPPH, el cuál fue calculado a partir de la gráfica de regresión polinómica .(Guija *et al.*, 2015, pp.0-4).

También es posible expresarle como porcentaje de inhibición de radicales libres DPPH* (%I), el mismo que se calcula bajo la siguiente fórmula de acuerdo con Martins et al (Martins et al., 2016,pp.34-39)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100$$

Donde:

Ao = Absorbancia del control

As = Absorbancia del extracto a ensayar

2.10 Preparación del estándar McFarland

De acuerdo al método propuesto por la FDA, se preparó el estándar Mcfarland, que fue usado para estandarizar la concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL, de la suspensión bacteriana empleada en el ensayo de fotoprotección a través de la comparación de turbidez.

La preparación del estándar Mcfarland se realizó, a través de la mezcla de cloruro de Bario (BaCl₂) al 1% y de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 1% en las siguientes proporciones:

Tabla 1-2: Escala de concentración del estándar a diferentes proporciones de BaCl₂ y H₂SO₄

N.º	BaCl ₂ 1%	H ₂ SO ₄ 1%	UFC/mL
0.5	0.05	9.95	1.5×10^8
1.0	0.10	9.90	3.0×10^8
2.0	0.20	9.80	6.0×10^8
3.0	0.30	9.70	9.0×10^8
4.0	0.40	9.60	1.2×10^9
5.0	0.50	9.50	1.5×10^9
6.0	0.60	9.40	1.8×10^9
7.0	0.70	9.30	2.1×10^9
8.0	0.80	9.20	2.4×10^9
9.0	0.90	9.10	2.7×10^9
10.0	1.0	9.00	3.0×10^9

Fuente:(Rodríguez, 2010)

La reacción produce la precipitación del Cloruro de Bario por acción del ácido sulfúrico provocando una solución de color blanquecina turbia. Obtenidas las soluciones con diferentes proporciones de la mezcla entre BaCl₂ y H₂SO₄, se midió en el espectrofotómetro a 625 nm, cuyos valores deben estar entre 0.08-0.1. Una vez obtenidas las absorbancias se realizó la curva de calibración con el estándar McFarland Número 1,2,3,4,5 y utilizando la ecuación de la recta resultante se reemplazó el valor de la absorbancia para saber el número de estándar McFarland de la suspensión a utilizar (Rodríguez, 2010).

2.11 Determinación de la actividad fotoprotectora por el método de muerte celular inducida sobre cepas de *Escherichia coli*

La actividad fotoprotectora *in vitro* de las hojas de *Lippia scorodonioides* se determinó por el método de muerte celular inducida por radiación UVB, utilizando el modelo bacteriano *Escherichia coli*, ATTC 25922, en referencia al estudio realizado por Ávila Acevedo (Avila-Aceved, et al., 2017, pp 72-81), con pequeñas modificaciones.

Se cultivó una cepa de *Escherichia coli*, ATTC 25922, en caldo cerebro corazón para su reactivación durante 18 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo las cepas se cultivaron en Agar Muller Hinton, para su nutrición y crecimiento, a las mismas condiciones. Una vez obtenidas las cepas bacterianas reactivadas y nutridas, se procedió a diluirlas en suero fisiológico, agitando vigorosamente para romper los agregados celulares y asegurarse que la suspensión sea homogénea, a la vez se comparó con el estándar McFarland 0.5 previamente preparado, a través del parámetro de turbidez, ayudándonos de un patrón de líneas horizontales para mejorar la visualización asegurándonos que sea lo más próximo posible a la concentración de 1.5×10^8 UFC/mL.

Se preparó una solución de 2000 ppm de *Lippia scorodonioides*, pesando 50 mg del extracto seco y aforándolo a 25 mL, con etanol al 70%, a partir de esta solución se prepararon a través de diluciones, soluciones de 200 y 20 ppm.

Una vez preparada la suspensión bacteriana y las soluciones de la muestra de ensayo a diferentes concentraciones, se procedió a colocar en tubos de cuarzo de 1cm de diámetro 5mL de suspensión bacteriana, para cada concentración y 5mL de las soluciones de extractos. Se colocó los tubos de cuarzo que contenían la suspensión bacteriana en una gradilla, detrás de cada uno de los tubos que contenía los extractos de *Lippia scorodonioides* a diferentes concentraciones, formando así una unidad experimental. Dicha unidad experimental fue irradiada utilizando una lámpara de UV-B marca Philips Broadband TL 40 w/12 RS, a una intensidad de radiación de 0.60 J/cm². La determinación se realizó durante tres horas, con intervalos de 30 minutos (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos), tiempo en el cual se procedió a sembrar aproximadamente 5µL de la suspensión bacteriana en agar Muller Hilton, tomando en cuenta que en los tiempos de 0 y 30 minutos se realizó diluciones de las bacterias antes de realizar la siembra (1:5000). Después de la incubación de las bacterias a 37°C, por 18 horas se procedió a contar el número de UFC sobrevivientes a la radiación. (Avila-Aceved, et al., 2017, pp 72-81)

Para esta determinación se utilizó estándares como etilhexil metoxicinamato (OMC) y octildimetil-PABA (pamidato O) y como blanco etanol al 70%, Todos fueron tratados con la misma metodología que la muestra. Cada muestra se procesó por triplicado.

2.11.1 Análisis estadístico de los datos.

Las UFC de colonia de *Escherichia coli* sobrevivientes a la exposición a radiación UVB, se transformaron a datos obtenidos del área bajo la curva (ABC), tanto para controles positivos como para el extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* a concentraciones de 20, 200, 2000 ppm. El tratamiento de los datos se realizó mediante el programa IBBM SPSS STATICS 23, aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, para determinar si los datos se encuentran dentro de una distribución normal. Seguidamente se realizó el test de ANOVA de un factor y prueba de Tukey.

2.12 Determinación del factor de protección solar (FPS) in vitro, por el método de Mansur

Se realizó un análisis espectrofotométrico del extracto seco de *Lippia scorodonioides*, preparando una solución de 10 ppm, de la misma manera que los controles (OMC Y Pamidato-O). Se procedió a medir las muestras en longitudes de onda de 290-320 nm con intervalos de 5 nm, utilizando como blanco etanol al 70%. (Soares et al., 2009, pp.282-288)

El cálculo del FPS, se realizó a través de la siguiente ecuación matemática:

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

Donde:

CF = factor matemático

EE(λ) = efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda

I(λ) = intensidad de luz solar de longitud de onda

A(λ) = Absorbancia de la muestra ensayada.

La relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de luz solar, son valores que ya vienen establecidos, es decir son constantes como se indica

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 5-2: Tabla de los valores de EE X I preestablecidos
Fuente: (Mansur et al., 1986)

2.13 Ensayo de Irritación Ocular

Esta prueba permite estimar *in vitro* la capacidad de irritación ocular, de sustancias y productos cosméticos. Para este ensayo se utiliza la membrana corioalantoidea del huevo de gallina del décimo día de embrionación, tiempo en el cual el tejido nervioso y de la percepción no se ha desarrollado.

2.13.1 HET-CAM

Inicialmente se incuban huevos de gallina, fértiles durante 10 días, en una incubadora a 37 °C y humedad relativa de 60-80%. En el transcurso del tiempo de la incubación es posible observar al tercer día, si el huevo fue fértil con la ayuda de una linterna con luz led en completa oscuridad, ya que se aprecia las primeras invenciones en el huevo.

Se preparó la muestra a ensayar a una concentración de 500 ppm, para lo cual se pesó 12.5 mg del extracto seco de *Lippia scorodonioides* y se aforó a un balón de 25 mL, con agua destilada. Una vez obtenida esta solución se realizó diluciones para obtener soluciones a concentraciones de 250, 125, y 62.5 ppm.

En el décimo día de incubación, se procede romper muy cuidadosamente el cascarón que recubre la cámara de aire del huevo, seguidamente se retira con la ayuda de unas pinzas pequeñas la membrana que recubre la (CAM) membrana corioalantoidea. Una vez descubierta la (CAM), se coloca 300 µL de los extractos a ensayar, en el instante se observa cuidadosamente la membrana, durante 5 minutos, y se registra el tiempo en segundos en el que se produce las siguientes reacciones si fuese el caso: hemorragia, lisis y coagulación. En el caso de no existir ninguna de las reacciones antes mencionadas se registrará como 301 segundos. (Costa Sônia, et al., 2015, pp.413-418)

Para esta determinación se utilizó un control positivo (NaOH 0.1M) para tener una referencia del efecto irritante (hemorragia, lisis y coagulación) y un control negativo (agua destilada), para dar validez a la determinación. El procedimiento fue el mismo que para la muestra ensayada a diferentes concentraciones. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados deben ser expresados en índice de irritación (IS), utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde:

H = tiempo en segundos necesario para comenzar las reacciones de hemorragia

L = tiempo en segundos necesario para comenzar las reacciones de lisis en el vaso

C = tiempo en segundos necesario para comenzar las reacciones de coagulación

La puntuación está clasificada en 4 categorías según Luepke (N.P.Luepke, 1985, pp.287-291).

Tabla 2-2: Clasificación en categorías de puntajes acumulados en la prueba HET-CAM

Puntaje acumulativo	Clasificación
0-0.9	No irritante
1-4.9	Irritante bajo
5-8.9	Irritante moderado
9-21	Irritante severo

Fuente: (N.P.Luepke, 1985, pp.287-291).

2.13.2 CAM-TBS

Este método es cuantitativo para evaluar la toxicidad de formulaciones. Para esta determinación se procedió de la misma manera que en el HET-CAM, hasta dejar al descubierto la membrana corioalantoidea, siendo la muestra a ensayar soluciones de *Lippia scorodonioides* a concentraciones de 62.5, 125, 250, 500 ppm, como control positivo se utilizó Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M y como control negativo Agua destilada.(Mansur et al., 2016, pp.251-258)

Una vez descubierto la membrana corioalantoidea, se colocó un anillo de goma, delimitando la parte de la membrana que fue tratada. Dentro del anillo de goma se colocó 300 µL de los extractos, se dejó actuar por 20 segundos y seguidamente se lavó la parte tratada con suero fisiológico. Posteriormente se colocó 500 µL de azul tripán durante 1 minuto, transcurrido el tiempo se lavó con agua destilada. Luego del tratamiento se cortó cuidadosamente la parte tratada de la membrana corioalantoidea, se registró su peso y brevemente se introdujo en un tubo con 5 mL de dimetilformamida para capturar el colorante fijado. Se procedió a centrifugar el tubo a 1500 rpm durante 5 minutos y finalmente se midió la absorbancia de la formamida con el colorante en el espectrofotómetro a 595 nm y se comparó con una recta patrón de concentraciones conocidas del colorante azul tripán (5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M) (Lagarto et al., 2006, pp.699-702). La determinación se realizó por triplicado. Los resultados se expresan en cantidad de colorante absorbido utilizando la siguiente fórmula:

$$CA = b \times \frac{5}{1000} \times 10^9 \text{ nmoles}$$

Donde:

CA = cantidad de colorante absorbido

B = Concentración del colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón) mg de membrana.

Con el resultado obtenidos tanto de los controles (positivo y negativo) como para la muestras ensayadas a diferentes concentraciones, se determinó la categoría dentro de la clasificación de irritación que corresponde según García (García et al., 2004, pp. 103-107).

Potencial de irritación	Categoría
< 0,100 nmoles/mg	no irritante
0,100 – 0,150	moderadamente irritante
> 0,150	irritante

Figura 6-2: Clasificación de las sustancias de acuerdo al potencial irritante determinado por el método CAM-TBS.

Fuente: (García et al., 2004, pp. 103-107).

2.14 Ensayo de Genotoxicidad

Para determinar la genotoxicidad del extracto seco de *Lippia scordonioides* se procedió con el método de micronúcleos utilizando semillas de *Vicia faba* var. Minor descrito por Ávila-Acevedo (Ávila-Acevedo, et al., 2017, pp 72-81).

Las semillas de *Vicia faba* fueron seleccionadas de tal manera que tengan un tamaño similar, seguidamente se colocaron en agua y almacenaron a 4°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se retiró la testa de cada una de las semillas y se las colocó en una bandeja de vidrio en medio de dos capas de algodón humedecido para facilitar su germinación, se tapó la bandeja con papel film realizando pequeños agujeros para favorecer la entrada de oxígeno, se almacenó a temperatura ambiente durante 7 días, humedeciendo el algodón paulatinamente. Una vez cumplido el tiempo las raíces primarias alcanzaron una longitud de entre 1-2 cm. Estas raíces se encontraban listas para su tratamiento. Para lo cual se preparó una solución de 0.40% (p/v), pesando 100 mg del extracto seco de *Lippia scorodonioides* y se aforó a 25 mL con agua destilada, de esta solución se realizaron diluciones de tal manera que se obtuvo concentraciones de 0.20, 0.10 y 0.05 % (p/v). Se utilizó como control positivo Etanol absoluto y como control negativo agua del grifo (Orbegoso y Gonza, 2017, pp.203-213).

Fueron seleccionadas al azar 4 semillas por tratamiento y se sometieron a los extractos de *Lippia scorodonioides* de diferentes concentraciones, control positivo y negativo durante 48 horas a 22°C. Al culminar el tiempo de exposición para cada tratamiento, se colocó las raíces en solución Farmer (ácido acético 1: 3 y Metanol absoluto) a 4°C por 24 horas. Cumplido el tiempo se hidrolizó las raíces en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 1N durante 6 minutos a 55°C (en baño maría) para romper los enlaces de la pared celular, seguidamente se lavó 3 veces con agua destilada para eliminar el HCl y luego fue puesto en etanol al 70% durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se maceró las raíces en ácido acético al 45% por 30 minutos. Al finalizar el tiempo, las raíces tratadas fueron cortadas desechando aproximadamente 1mm de la punta de la raíz, de tal manera que se tomó la región de células del meristemo F1, a través de un fino corte transversal, rápidamente se colocó en un portaobjetos y se coloreó con acetato de orceína al 1% durante 5 minutos, se lavó con ácido acético al 45%, se colocó un portaobjetos haciendo un poco de presión y se observó al microscopio óptico con el lente de 40X. Se contó las células en cada una de las fases y las células en interface con micronúcleos (Orbegoso y Gonza, 2017, pp.203-213).

Para calcular la genotoxicidad, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\%MI = \frac{N^{\circ} \text{ de células por cada fase}}{1000} \times 100$$

Donde:

%MI = porcentaje del índice mitótico

N.º = Número de células por cada fase

$$\text{MCN} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células de interfase con mcn}}{1000} \times 100$$

Donde:

MCN = micronúcleos

N.º = Número de células en interfase con micronúcleos.

2.15.1 Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos del índice de micronúcleos y el índice mitótico, tanto para controles positivos como para el extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* a concentraciones de 62.5, 125, 250, 500 ppm. El tratamiento de los datos se realizó mediante el programa IBBM SPSS STATICS 23, aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, para determinar si los datos se encuentran dentro de una distribución normal. Seguidamente se realizó el test de Chi cuadrado, tras comprobar que no existía una distribución normal de los datos.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de la materia vegetal

Al someterle a la droga cruda a las pruebas, para control de calidad, descritas en el capítulo II, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de *Lippia scorodonioides*

PARÁMETRO	<i>Lippia scorodonioides</i>	Límites establecidos por la USP #35
Contenido de humedad (%)	5.04 ± 0.15%	14%
Contenido de cenizas totales (%)	12.02 ± 0.05%	≤12%
Contenido de cenizas solubles en agua (%)	10.84 ± 0.06%	≤7%
Contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (%)	1.17 ± 0.01%	≤5%

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

3.1.1 Determinación del contenido de humedad

El control de calidad de la droga cruda previo a realizar la investigación es necesario, para garantizar las condiciones óptimas del material vegetal, y por tanto que los resultados obtenidos sean fiables. El contenido de humedad de las hojas de *Lippia scorodonioides*, se realizó por el método gravimétrico, mediante secado en estufa con circulación de aire caliente, el valor obtenido fue de 5.04%, estas cifras se encuentran dentro de los límites establecidos por la USP # 35 (Tabla 1-3), en donde nos establece un límite máximo del 14%. Estos resultados nos indican que el material vegetal tiene un bajo contenido de agua lo que ayuda a ralentizar procesos de degradación de metabolitos y principios activos por reacciones enzimáticas, otra ventaja es que previene la proliferación de microorganismo como hongos y

bacterias. Garantizando así la estabilidad y calidad del material vegetal. (Miranda, 2000, pp.34-35)

3.1.2 *Determinación de cenizas totales*

Este ensayo se realizó por el método gravimétrico, basado en el residuo de la incineración de la muestra. Fue analizado para determinar el contenido de minerales o materia inorgánica que pueden ser propias de la planta o provenir de la tierra durante de la recolección y almacenamiento del material vegetal (Farmacognosia, 2008). El resultado obtenido de esta determinación fue 12.02%, a pesar de que este valor es similar al límite máximo establecido por la USP # 35, cuyo valor es de 12%, se puede decir que se encuentra en el rango permitido (Tabla1-3), por lo que se garantiza la calidad e identidad de la materia vegetal. Valores que superan en gran cantidad el límite superior nos indica la existencia de metales pesados y residuos inorgánicos como sílice, fosfatos, carbonatos, silicatos, los cuales podrían interferir en los resultados durante la investigación (Miranda, 2000, p.32).

3.1.3 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Esta determinación se realizó a través del método gravimétrico y nos ayuda a considerar el contenido de cenizas fisiológicas es decir compuestos naturales, así como las sales solubles presentes en la materia vegetal. El valor obtenido de la determinación fue de 10.84%, este porcentaje supera el límite máximo establecido por la USP # 35, que es de 7% (Tabla1-3). Este resultado se debe a que en el género *Lippia* por si mismas posee un cierto contenido de minerales, como se describe en los componentes de *Lippia graveolens* (Morataya, 2006), consecuencia del ambiente en el que crecen como es el bosque seco.

3.1.4 *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

El contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico se realizó por el método gravimétrico. Este parámetro de calidad ayuda a determinar la presencia de sílice en la droga vegetal por contaminación con tierra o arena. El resultado obtenido fue de 1.17%, este porcentaje se encuentra dentro de los límites establecidos por la USP # 35, que es de 5% (Tabla1-3), dicho resultado nos indica la ausencia de contaminación de la materia vegetal con tierra silíceo o arena (Miranda, 2000, p.33).

Los resultados obtenidos en el control de calidad de la droga cruda, nos indicó que cumple con las condiciones adecuadas para llevar a cabo la presente investigación

3.2 Tamizaje Fitoquímico

Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de *Lippia scorodonioides*

ENSAYO	TIPO DE METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Grasas	+++	N/A	N/A
Dragendorff	Alcaloides	-	+++	-
Mayer	Alcaloides	-	+ (opaco)	-
Wagner	Alcaloides	-	+	-
Baljet	Lactonas y cumarinas	++	++	N/A
Lieberman-Burchard	Triterpenos y esteroides	+ (verde claro)	+ (verde claro)	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	+	N/A
Resinas	Resinas	N/A	-	N/A
Fehling	Azúcares reductores	N/A	+++	++
Espuma	Saponinas	N/A	+	-
Cloruro Férrico (FeCl₃)	Compuestos fenólicos	N/A	+ (verde intenso)	+ (verde oscuro)
Borntrager	Quinonas	N/A	+	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	+	-
Antocianinas	Antocianidinas	N/A	-	N/A
Mucilagos	N/A	N/A	N/A	-
Nihidrina	N/A	N/A	+++	N/A
Principios amargos	N/A	N/A	N/A	-

+++ (Abundante), ++ (Moderado), + (Escaso), - (Ausencia), N/A (No aplica)

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

La identificación cualitativa de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Lippia scorodonioides* se realizó a través del tamizaje fitoquímico de la droga vegetal, el cual

consistió en la extracción de la planta utilizando solventes de creciente polaridad: éter etílico, etanol, y agua respectivamente, lo que provocó un cambio de pH en el medio y ayudó a extraer los metabolitos de acuerdo a la solubilidad y polaridad, generando reacciones de coloración y/o precipitación lo que permitió determinar la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos (Miranda, 2000, pp. 38-45).

En los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico se logró identificar en el extracto etéreo compuestos liposolubles, dentro de los cuales se tuvo la presencia de gran cantidad de grasas, una cantidad moderada de Lactonas y cumarinas, mientras que en cantidades pequeñas triterpenos y esteroides. En el extracto alcohólico se destacó compuestos de polaridad media como: gran cantidad alcaloides y azúcares reductores, lactonas y cumarinas en cantidad moderada y catequinas, triterpenos, esteroides, saponinas, quinonas, compuestos fenólicos y flavonoides en pequeñas cantidades. En el extracto acuoso se ratificó la presencia de compuestos fenólicos y azúcares reductores.

A través de los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de *Lippia scorodonioides* se evidenció la presencia de compuestos fenólico y flavonoides, que son de interés farmacológico debido a las propiedades antioxidantes, inmunomoduladores, antiinflamatorias, anticancerígenas y sobre todo fotoprotectoras frente a la radiación solar, que fue evaluada en la presente investigación (Rabinovich y Kazlouskaya, 2018).

Es importante resaltar que hasta el momento no existen evidencias de estudios fitoquímicos realizados específicamente a *Lippia scorodonioides*, sin embargo, en estudios de plantas que pertenecen al género *Lippia* como es el caso de *Lippia alba* y *Lippia graveolens* concuerda con la presencia de los metabolitos secundarios identificados en este estudio, sobre todo de compuestos fenólicos y flavonoides (Morataya, 2006).

3.3 Determinación del control de calidad del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*.

Tabla 3-3: Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*

Parámetros	Resultados
Requisitos organolépticos:	
Olor	Herbal
Sabor	Amargo
Color	Verde oliva
Aspecto	Líquido
Densidad	0,905 g/ml
pH	6,9
Índice de refracción	1,362
Sólidos Totales	1,479 % \pm 0,005

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Fueron determinados los parámetros físico-química y organoléptica para el control de calidad del extracto hidroalcohólico al 70% de *Lippia scorodonioides* previo a su concentración y posterior liofilización. En el análisis de las propiedades organolépticas dio como resultado un olor herbal característico, un aspecto líquido homogéneo sin presencia de fases, un sabor amargo, una coloración verde oliva. La densidad relativa (0,905 g/ml) es muy cercana a la del agua, dando a notar en su aspecto líquido. En el caso de los valores obtenidos de pH, concuerdan con las características levemente ácidas que se extraen en estos extractos como flavonoides, fenoles, taninos, además este valor de pH, presenta un comportamiento neutral, lo que provoca una disminución de la catálisis ácida o básica que habitualmente es causa de la degradación hidrolítica de los principios activos (Bermejo et al., 2014, pp.670-680). El valor obtenido en el índice de refracción nos indica que existe un contenido de sólidos totales, los cuales se encuentra en correlación. Al comparar estos resultados con un estudio similar realizado a *Lippia citriodora*, se puede decir que presentan características muy semejantes (Zambrano, 2015). Todas estas características físico-químicas que presenta el extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* garantiza su estabilización y conservación durante un largo tiempo.

3.4 Extracto seco de hojas de *Lippia scorodonioides*

Una vez concentrado en rotavapor, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lippia scorodonioides* fue congelado y liofilizado, consiguiendo así el extracto seco como un polvo fino y homogéneo de color marrón intenso y consistencia sólida. A partir de 50 g de droga vegetal seca y triturada se obtuvieron 5.3685 g de extracto seco; por tanto, el rendimiento de extracción por este método fue de 10.74%. En la actualidad se recurre a técnicas como el liofilizado para mantener el contenido vitamínico, enzimático y hormonal, de preparaciones vegetales frescas, sobre todo para sustancias termodegradables debido a su facilidad para desnaturalizarse. (Miranda, 2000, p.46)

3.5 Determinación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales del extracto seco de *Lippia scorodonioides*, se realizó a través de espectrofotometría utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, se tomó como referencia la ecuación de la recta $A = 0,001C + 0,0017$ ($R^2 = 0,999$) que corresponde a la curva de calibración del estándar, de ácido gálico de soluciones de concentración de 20, 40, 60, 80, 100 ppm respectivamente.

El ensayo se llevó a cabo con una concentración del extracto etanólico de *Lippia scorodonioides* de 200 ppm, con el objetivo que la absorbancia obtenida, se encuentre dentro de la curva de calibración del estándar de ácido gálico. Dando una concentración de 0,069 ppm, valor que se utilizó para realizar los cálculos correspondientes para la obtención del contenido de fenoles totales expresados en mg Equivalentes de Ácido Gálico /g de extracto seco.

Tabla 4-3: Absorbancias del estándar de ácido gálico

Concentración de ácido Gálico ppm	Absorbancia
20	0,023
40	0,041
60	0,061
80	0,082
100	0,103

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

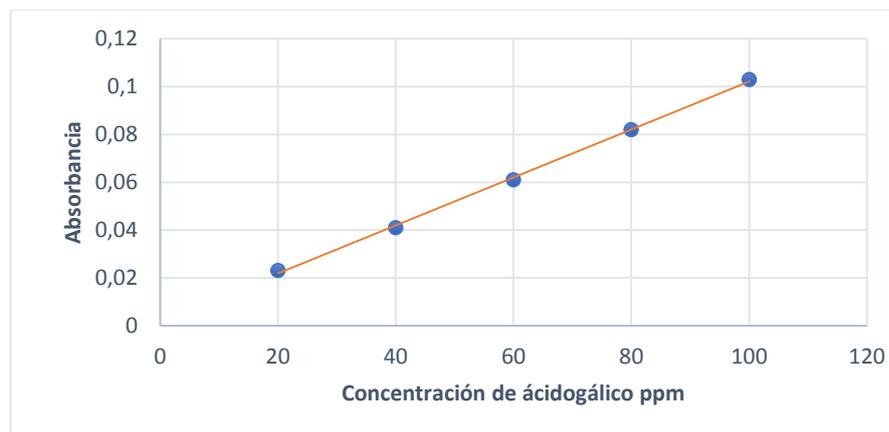


Gráfico 1-3: Curva de calibración del ácido Gálico

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Tabla 5-3: Contenido de fenoles totales de hojas de *Lippia scorodonioides*

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	FENOLES TOTALES	
	mg Equivalentes de Ácido Gálico /g de extracto seco	g Equivalentes de Ácido Gálico /100g de extracto seco
Extracto etanólico de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i>	11.48 ± 0.29	1.148 ± 0.29

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

El contenido de fenoles totales del extracto etanólico al 70% de hojas de *Lippia scorodonioides* fue de 11.48 mg GAE / g extracto seco, lo que en términos de porcentaje significa que existe 1.148 g GAE / g extracto. Al comparar estos resultados con ciertas especies del género tales como *Lippia triphylla*, cuyo extracto etanólico presentó 2.15 mg GAE / g extracto (Zengin et al, 2017, pp.135-141); se podría decir que la cantidad de fenoles totales presentes en *Lippia scorodonioides* es relativamente alta; sin embargo es considerablemente baja en comparación con *Lippia graveolens* cuyo valor fue de 304.28 mg GAE / g extracto (Avila-Aceved, el al., 2017, pp 72-81). Teniendo en cuenta estos resultados se puede apreciar la variación en el contenido de fenoles totales entre las diferentes especies. Esta variación puede darse por distintos factores, ya sea por las condiciones ambientales, como la falta de nutrientes, déficit de agua que intervienen en el crecimiento de la planta y disminuyen la velocidad fotosintética, diferentes morfologías y antecedentes epigenéticos relacionados con el origen regional (Neugart et al., 2018, pp.460-478). Debido a que la planta fue recolectada en una zona seca, cerca de Guayllabamba (Pichincha), se podría decir que las condiciones ambientales intervinieron en el desarrollo de ciertos metabolitos. Por ende, el resultado del contenido de fenoles totales fue considerablemente bajo para *Lippia*

scorodonioides, mostrando una gran correlación con los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico como en los demás ensayos.

3.6 Determinación de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales de las hojas de *Lippia scorodonioides*, se realizó por el método espectrofotométrico y utilizando cloruro de aluminio (AlCl₃), para lo cual se elaboró la curva de calibración del estándar de quercetina con soluciones de concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 ppm la ecuación de la recta resultante fue: $A = 0,0014C + 0,0144$ y su coeficiente de correlación de $R^2 = 0,999$.

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se expresan en mgEQ/g de extracto seco y en %EQFT

Tabla 6-3: Absorbancias del estándar de Quercetina

Concentración de ácido Gálico ppm	Absorbancia
20	0,044
40	0,07
60	0,098
80	0,126
100	0,157

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

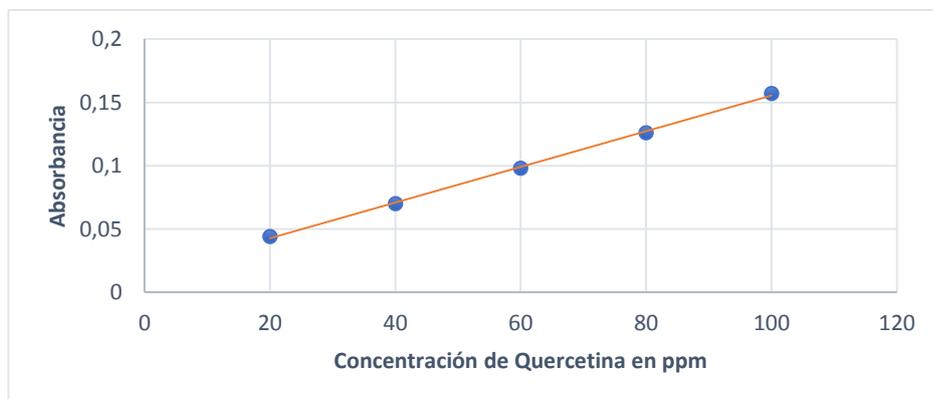


Gráfico:2-3. Curva de calibración de Quercetina

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Tabla 7-3: Contenido de flavonoides totales de hojas de *Lippia scorodonioides*

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	FLAVONOIDES TOTALES	
	mg Equivalentes de quercetina /g de extracto seco	g Equivalentes de quercetina / 100 g de extracto seco
Extracto etanólico de hojas de <i>Lippia scorodonioides</i>	3.00 ± 0,063	0.3 ± 0,063

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

El contenido de flavonoides totales presentes en las hojas de *Lippia scorodonioides* fue de 3.00 mg EQ/g de extracto seco, lo que representa en términos de porcentaje 0.30 EQ/100 g de extracto seco (Tabla 7-3). Como se puede observar las cantidades de flavonoides totales son relativamente bajas en comparación con estudios semejantes como es el caso de *Lippia dulcis* en donde reportó un porcentaje de 45.68 EQ/100 g de extracto seco (Cárdenas y Pinedo, 2016,p.43); esta gran diferencia puede deberse a que, como se sabe la radiación UV-B es un importante regulador del metabolismo secundario de las plantas, desencadenando la acumulación de, entre otros, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, etc. dicha acumulación está fuertemente influenciada por la duración de la exposición y la dosis de la radiación UV-B; sin embargo esta acumulación también depende de la edad fisiológica de la planta, de la estructura morfológica de la planta y de las variaciones genotípicas entre especies, orígenes y cultivares (Neugart et al., 2018, pp.460-478). Tomando en cuenta que *Lippia scorodonioides* es un arbusto con hojas pequeñas y crece generalmente cerca de bosques secos, donde también existen árboles de gran tamaño que le protegen de cierta manera a los arbustos y demás plantas pequeñas de la radiación, se puede respaldar el bajo contenido de flavonoides totales obtenidos, encontrándose en concordancia con los demás resultados de los ensayos de esta investigación.

3.7 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH*

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto de *Lippia scorodonioides*, mediante el método del radical libre DPPH*, utilizando como referencia ácido gálico los resultados se reportaron en la siguiente tabla:

Tabla 8-3: Resultados de la actividad Antioxidante IC_{50} del extracto de *Lippia scorodonioides*

Muestra	Actividad Antioxidante IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	Valores de Referencia IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
Extracto etanólico de <i>Lippia scorodonioides</i>	1004.89 ± 56.93	Óptimo $IC_{50} < 15 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bueno $15 \mu\text{g mL}^{-1} < IC_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) Promedio $50 \mu\text{g mL}^{-1} < IC_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) Débil $IC_{50} \geq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido gálico	$23.27 \pm 1,64$	

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

EL DPPH* es un radical libre, que produce una solución violeta en etanol y se reduce en presencia de una molécula antioxidante dando lugar a soluciones de etanol sin colorantes (Mensor et al., 2001, pp.127-130). El extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* es capaz de neutralizar el DPPH*, presentando un valor de IC_{50} de $1004.89 \pm 56.93 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 7-3). Esta actividad es menor que la presentada por el ácido gálico, el control positivo ($IC_{50} 23.27 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$). Y de acuerdo a la clasificación propuesta por Martins et al. (Martins, Francislene et al., 2016, pp.34-39), presenta una capacidad antioxidante débil ($IC_{50} \geq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). En comparación con ciertas especies del género tales como *L. sidiioides* ($5 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$) y *L. alba* ($9 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$) (Fabri et al., 2011, pp.840-846), se puede apreciar que tienen mayor capacidad antioxidante incluso que la reportada por el ácido gálico (utilizado como control positivo), mientras que un estudio realizado a *Lippia triphylla* reportó un valor de $113.77 \pm 2.75 \mu\text{g/mL}$ (Zengin et al, 2017, pp.135-141), que a pesar de tener una actividad mucho mejor que la de *Lippia scorodonioides* según la clasificación de Martins bordea los límites para considerarse como débil. Esta variación en la capacidad antioxidante entre las diferentes especies del mismo género se debe a factores ya mencionados anteriormente sobre todo al bajo contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, principales responsables de la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos para *Lippia scorodonioides* en esta determinación, fueron corroboradas con los valores obtenidos de fenoles y flavonoides, además mientras se realizaba el ensayo la solución violeta casi no fue contrarrestada por la muestra.

3.8 Preparación del estándar McFarland

El control de calidad del estándar McFarland se realizó mediante espectrofotometría, a través de la cual se obtuvo la curva de calibración con su respectiva ecuación de la recta como se puede observar en el Gráfico 3-3.

Tabla 9-3: Resultados de las absorbancias del Estándar McFarland a 625 nm

N.º estándar McFarland	Absorbancia (625nm)
1	0,189
2	0,388
3	0,592
4	0,775
5	0,956
X=0,5	0,099

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

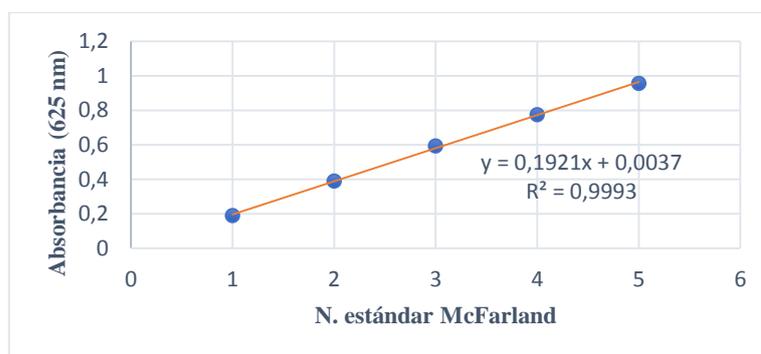


Gráfico 3-3: Curva de calibración del estándar McFarland

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

El valor de absorbancia obteniendo de la muestra fue de 0.099; el mismo que se encuentra dentro del rango (0.08-0.1) para el estándar McFarland N.º 0.5 de acuerdo a Koneman et al., (Koneman et al., 2006, p. 932). Al reemplazar este valor en la ecuación de la recta, se obtuvo un resultado de 0.5, lo que nos indicó que corresponde al estándar McFarland N.º 0.5.

A través de los resultados obtenidos, se estima que la turbidez que presentó el estándar McFarland N.º 0.5 corresponde a una suspensión bacteriana de concentración 5×10^8 UFC/mL aproximadamente (Rodríguez, 2010), gracias a esto se logró estandarizar a través del parámetro de turbidez la suspensión bacteriana de *E. coli*, que fue utilizada para el ensayo de la actividad fotoprotectora de *Lippia scorodonioides*.

3.9 Efecto de fotoprotección por el método de muerte celular inducida sobre cepas de *Escherichia coli*

Tabla 10-3: Efecto fotoprotector del control positivo etilhexil metoxicinamato (OMC)

TIEMPO	BLANCO UFC/mL	20 ppm UFC/ mL	200 ppm UFC/ mL	2000 ppm UFC/ MI
0	39300000 (±30129221,7)	59000000 (± 6082762,53)	52666666,67 (± 6806859,29)	56666666,67 (± 4163332)
30	0	3333333,33 (± 577350,27)	6666666,67 (± 1527525,23)	18333333,33 (± 2516611,48)
60	0	0	5333,33 (± 1154,70)	22000 (± 2000)
90	0	0	0	17333,33 (± 3055,05)
120	0	0	0	8000 (± 2000)
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Tabla 11-3: Efecto fotoprotector del control positivo octildimetil-PABA

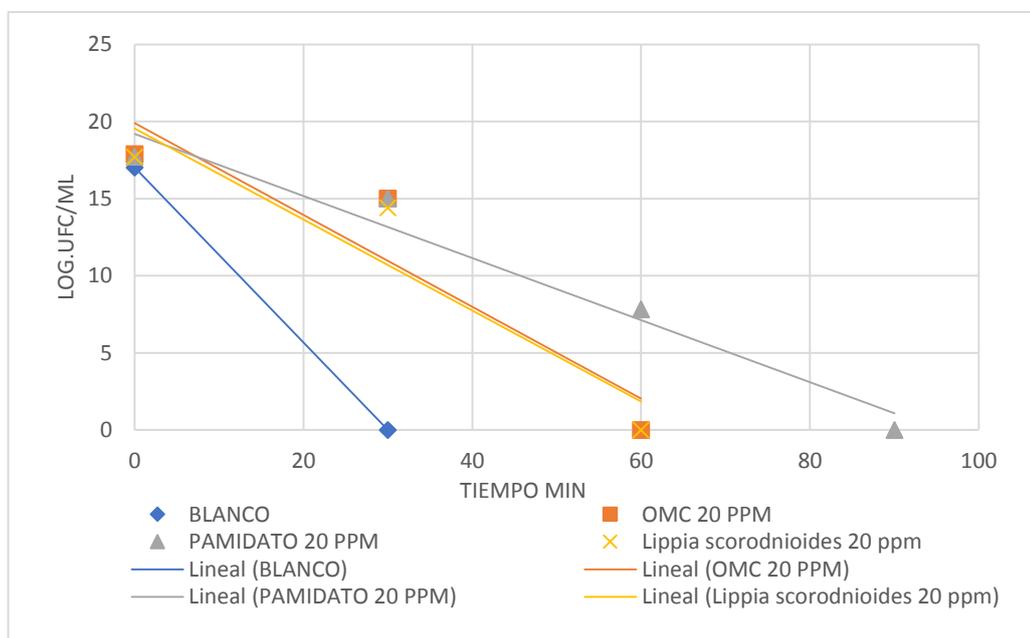
TIEMPO	BLANCO UFC/mL	20 ppm UFC/MI	200 ppm UFC/ml	2000 ppm UFC/ml
0	39300000 (±30129221,7)	50666666,67 (± 7505553,50)	55000000,00 (± 3464101,62)	52333333,33 (± 10214368,96)
30	0	3333333,33 (± 577350,27)	8666666,67 (± 1527525,23)	16000000 (± 1000000)
60	0	2666,67 (± 1154,70)	10000 (± 2000)	18000 (± 2000)
90	0	0	6666,67 (± 3055,05)	11333,33 (± 3055,05)
120	0	0	0	4666,67 (± 1154,70)
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Tabla 12-3: Efecto fotoprotector del extracto Hidroalcohólico de hojas de *Lippia scorodonioides*

TIEMPO	BLANCO UFC/mL	20 ppm UFC/MI	200 ppm UFC/ml	2000 ppm UFC/ml			
0	39300000 (±30129221,7)	48666666,67 (± 3055050,46)	48000000 (± 1000000)	50666666,67 (± 4618802,15)			
30	0	2000000 (± 1000000)	5666666,67 (± 577350,27)	10333333,33 (± 1527525,23)			
60	0	0	3333,33 (± 1154,70)	10000 (± 2000)			
90	0	0	0	0			
120	0	0	0	0			
150	0	0 </tr <tr> <td>180</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr>	180	0	0	0	0
180	0	0	0	0			

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018



Blanco

$$y = -0,5677x + 17,031$$

$$R^2 = 1$$

OMC 20 ppm

$$y = -0,2982x + 19,911$$

$$R^2 = 0,8671$$

PAMIDATO 20 ppm

$$y = -0,2013x + 19,201$$

$$R^2 = 0,9618$$

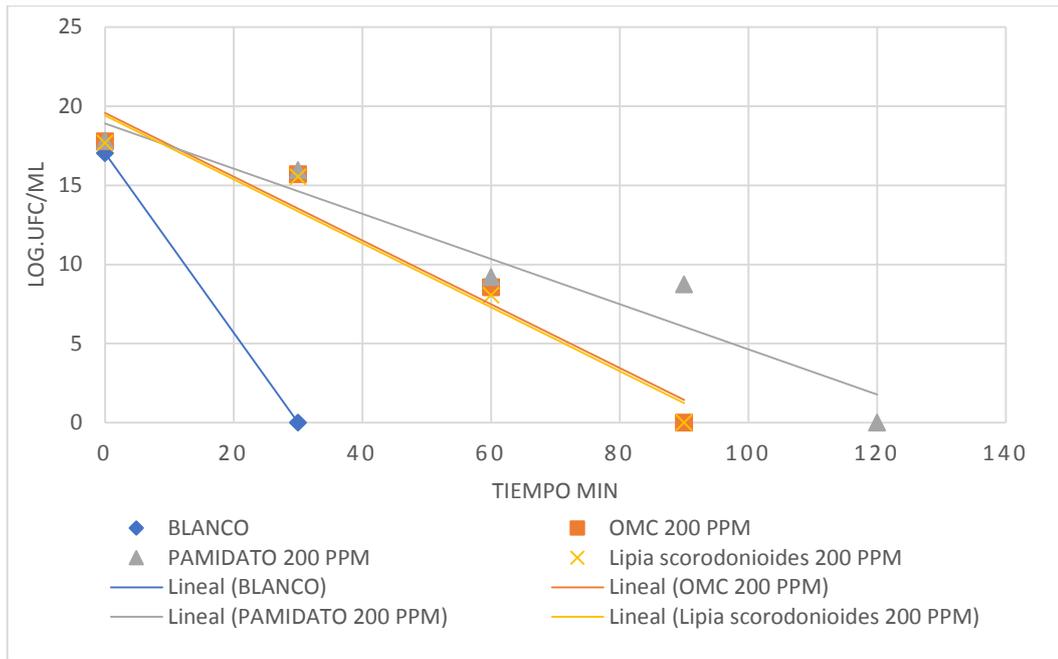
***Lippia scorodonioides*
20 ppm**

$$y = -0,295x + 19,554$$

$$R^2 = 0,8836$$

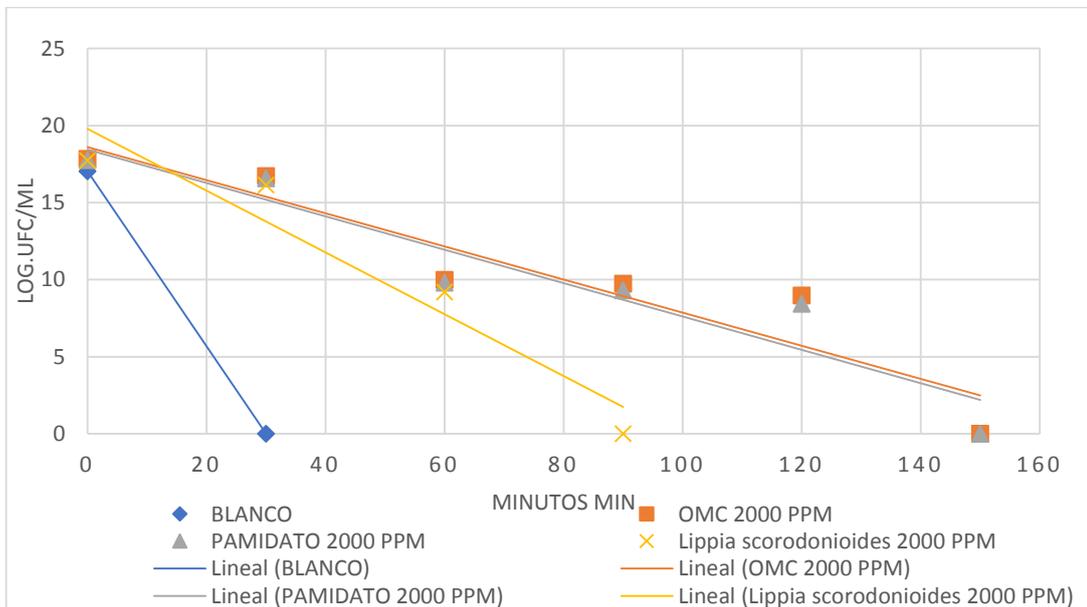
Gráfico:4-3. Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de *Escherichia. coli.* por UV-B Blanco, OMC 20 ppm, PAMIDATO 20 ppm, *Lippia scorodonioides* 20 ppm

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018



Blanco	OMC 200 ppm	PAMIDATO 200 ppm	Lippia scorodonioides 200 ppm
$y = -0,5677x + 17,031$	$y = -0,2015x + 19,576$	$y = -0,1429x + 18,918$	$y = -0,2018x + 19,405$
$R^2 = 1$	$R^2 = 0,9424$	$R^2 = 0,9264$	$R^2 = 0,9487$

Gráfico:5-3. Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de *Escherichia. coli*. por UVB Blanco, OMC 200 ppm, PAMIDATO 200 ppm, *Lippia scorodonioides* 200 ppm
Realizado por: Guaita, Mayra, 2018



Blanco	OMC 2000 ppm	PAMIDATO 2000 ppm	Lippia scorodonioides 2000 ppm
$y = -0,5677x + 17,031$	$y = -0,1074x + 18,601$	$y = -0,1083x + 18,439$	$y = -0,2005x + 19,794$
$R^2 = 1$	$R^2 = 0,8813$	$R^2 = 0,8974$	$R^2 = 0,9238$

Gráfico 6-3: Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de *Escherichia. coli* por UV-B Blanco, OMC 2000 ppm, PAMIDATO 2000 ppm, *Lippia scorodonioides* 2000 ppm
Realizado por: Guaita, Mayra, 201

El efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* se evaluó mediante la muerte celular inducida, utilizando *Escherichia coli* (ATCC 25922) como modelo celular y una lámpara de radiación UV-B (Philips, Broadband TL 40w/12 RS) como simulador solar. En los resultados obtenidos se puede observar que la población bacteriana que se encontraba con el blanco o control negativo, experimentó una muerte celular a los pocos minutos de haber sido sometidos a radiación UV-B, de tal manera que transcurridos los primeros 30 minutos del ensayo la población bacteriana fue reducida a cero, mientras que en el caso de las poblaciones bacterianas que se encontraban protegidas por los controles positivos y la muestra a las diferentes concentraciones, se vieron disminuidas en número de UFC sobreviviente, sin haber sido eliminadas totalmente, por lo que se puede decir que a los 30 minutos todas las muestras ensayadas poseen actividad fotoprotectora, dando a notar que las UFC sobrevivientes son directamente proporcional a la concentración de las muestras. El extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* protegió a sus poblaciones bacterianas hasta los 60 minutos de manera similar al control positivo etilhexil metoxicinamato (OMC), tiempo en que alcanzó la muerte celular total la población bacteriana protegida por *Lippia scorodonioides*, reduciéndose a 0 el número de UFC, mientras que el control positivo octildimetil-PABA (Pamidato O), protegió por más tiempo a sus poblaciones bacterianas incluso a bajas concentraciones. Al transcurrir los 150 minutos todas las poblaciones bacterias protegidas por los controles experimentaron la muerte celular total. En una investigación similar realizada a *Lippia graveolens* (Avila-Aceved, et al., 2017, pp 72-81), presentó resultados favorecedores para esta especie en contraste con los resultados obtenidos por *Lippia scorodonioides*, a pesar de ser parte del mismo género, estos resultados se deben por diversos factores siendo los principales el contenido de metabolitos secundarios sobre todo fenoles y flavonoides.

La exposición de un cultivo bacteriano a radiación UV-B, genera una rápida disminución en la población de bacterias debido al daño del ADN (Taghipour, 2004, pp.3940-3948). De acuerdo a esto, con los resultados obtenidos del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* se puede considerar que posee un efecto fotoprotector, aunque no con tanta capacidad como los controles positivos. Por lo que estos resultados se encuentran en concordancia con el bajo contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. Sin embargo, por la existencia de estos compuestos (fenoles y flavonoides), el extracto podría ser aplicado a una formulación, adicional a los compuestos generalmente utilizados para mejorar indirectamente su actividad fotoprotectora.

3.9.1 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados del efecto fotoprotector del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*, se realizó con los datos del área bajo la curva (ABC), con los valores obtenidos por el blanco, los controles positivos y la muestra en estudio, a concentraciones de 20, 200, 2000 ppm. Se comprobó la distribución normal de los datos a través de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

Fue aplicado el test de ANOVA de un factor, que ayudó a verificar si existe diferencia entre la actividad fotoprotectora de los controles y el extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*.

Tabla 13-3: Test de ANOVA de un factor para la actividad fotoprotectora.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1464682320480 000000,000	9	1627424800533 33344,000	5,408	,001
Within Groups	6019060272000 00000,000	20	3009530136000 0000,000		
Total	2066588347680 000000,000	29			

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Planteamiento de las hipótesis:

Ho: No existe diferencia en la actividad fotoprotectora entre los fotoprotectores (etilhexil metoxicinamato , octildimetil-PABA y *Lippia scorodonioides*). $p \geq 0.05$

H1: Existe diferencia en la actividad fotoprotectora entre los fotoprotectores (etilhexil metoxicinamato , octildimetil-PABA y *Lippia scorodonioides*). $p \leq 0.05$

Decisión:

Con los resultados obtenidos mediante del test ANOVA de un factor, existen argumentos para desechar Ho, con un nivel de significancia de 0.00 siendo menor a 0.05. Por lo tanto estadísticamente se puede decir que existe diferencia significativa en la actividad fotoprotectora entre los fotoprotectores (etilhexil metoxicinamato , octildimetil-PABA y *Lippia scorodonioides*)

3.10 Factor de protección solar (FPS)

El Factor de protección solar del extracto de *Lippia scorodonioides*, fue determinado mediante la ecuación de Mansur.

El ensayo debía haberse llevado a cabo con la concentración mínima utilizada en el ensayo de fotoprotección es decir 20 ppm, no fue posible realizarse a esta concentración debido a que las absorbancias reportadas por el espectrofotómetro eran constantes (erróneas) en todas las longitudes de onda, siendo el motivo para disminuir la concentración de las sustancias a ensayar a 10 ppm. Los resultados de la determinación se pueden observar a continuación (Tabla 14-3):

Tabla 14-3: Resultados del factor de protección solar (FPS) *in vitro*

Muestra	FPS <i>in vitro</i>
Extracto de <i>Lippia scorodonioides</i>	0.75 ± 0.10
etilhexil metoxicinamato (OMC)	12.50 ± 0.24
Pamidato-O (PAD)	17.81 ± 0.53

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

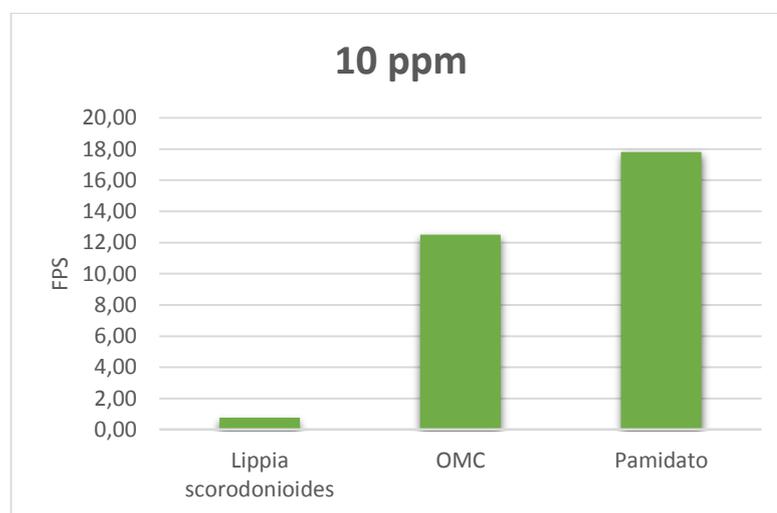


Gráfico 7-3: Resultados del FPS de *Lippia scorodonioides*, OMC, Pamidato *in vitro*

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

El extracto de *Lippia scorodonioides* presentó un valor de FPS de 0.75 ± 0.10 , para el control positivo etilhexil metoxicinamato (OMC) se obtuvo un valor de 12.50 ± 0.24 y para el

Pamidato de 17.81 ± 0.53 . Se puede apreciar que el valor más alto de factor de protección fue del control Pamidato, seguido por el control OMC y finalmente del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*. Los valores de factor de protección obtenidos de los controles son cercanos a los presentados en bibliografía en donde se reporta que el Octilmetoxicinamato presenta un FPS de 12.09 (El-Boury et al., 2007a, pp.244-251).

El valor de Factor de protección *in vitro* del extracto de *Lippia scorodonioides* puede deberse a que el método *in vitro* no es confiable por sí solo, ya que la eficacia del extracto se vio disminuida debido a que la medición se restringió solamente a un cierto rango del espectro y no al espectro en su totalidad, razón por la cual se requiere de otras pruebas complementarias para confirmar su resultado.

3.11 Ensayo de Irritación Ocular

El ensayo de irritación ocular, se llevó a cabo con un método alternativo al tradicional test de Draize, que causaba excesivo dolor y sufrimiento al animal de experimentación, razón por la cual se aplicó uno de los principios de las 3 R, que hace referencia a reemplazar los animales de experimentación, por otros métodos que no impliquen su uso. (Martínez-Hidalgo, 2007, pp.41-52) El método alternativo que se aplicó para medir la irritabilidad ocular del extracto de *Lippia scorodonioides* fue el HET CAM cualitativo (membrana corioalantoidea del huevo de gallina) y el CAM-TBS cuantitativo, cuyos resultados se correlacionan muy bien con los resultados *in vivo*, debido a que al décimo día de fecundación la membrana corioalantoidea del huevo de gallina se encuentra vascularizada semejando en la conjuntiva, por otra parte en esta etapa de fecundación el embrión no ha desarrollado el sentido de percepción por lo que no siente dolor (Murillo et al., 2003, pp. 187-192). Constituyéndose, así como un método sencillo, seguro y reproducible para evaluar la toxicidad del extracto en estudio. Los resultados obtenidos del HET-CAM y CAM-TBS se muestran en las Tablas 14-3 y 15-3 respectivamente. De acuerdo con la clasificación por puntajes, para las dos determinaciones los extractos y controles fueron clasificados como irritantes o irritantes severos.

3.11.1 HET-CAM

Tabla 15-3: Resultados del Método HET-CAM de los controles y de los extractos de *Lippia scorodonioides*

Grupo experimental	Concentración mg/l	Índice de irritación (IS)	Clasificación
NaOH 0,1M*	0.1 M	19.12 ± 0.28	Irritante severo
Agua destilada**		0	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	62.5 ppm	0	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	125 ppm	0	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	250 ppm	0	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	500 ppm	0	No irritante

* Control Positivo

**Control Negativo

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

El método HET-CAM, se fundamenta en la observación subjetiva de cambios macroscópicos, producidos en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina. Al aplicar el NaOH 0.1 M (control positivo), se observó un rápido desarrollo de hemorragia, seguida de lisis y finalizó con la coagulación de los vasos sanguíneos, dando un índice de irritación de 19.12 ± 0.28 , que de acuerdo a la clasificación propuesta por N.P.Luepke (N.P.Luepke, 1985, pp.287-291), se clasificó como Irritante severo. En el caso del agua destilada (control negativo) transcurridos los 5 minutos del ensayo no se observó reacción alguna, constatando que el agua destilada no produce irritación ocular. De la misma manera al evaluar el extracto de *Lippia scorodonioides* a las diferentes concentraciones, siendo la máxima 500 ppm, no produjo ningún cambio a la membrana por lo que el índice de irritación fue cero, clasificándose como no irritante. No se ha reportado estudios semejantes al género *Lippia*, sin embargo en un estudio realizado a *Marcetia taxifolia* (Costa Sônia, 2015), con un procedimiento similar, los resultados fueron similares al obtenido por *Lippia scorodonioides*.

3.11.2 CAM-TBS

La determinación del CAM-TBS, se realizó por el método espectrofotométrico, para lo cual se tomó como referencia la ecuación de la recta $A=30435C+0.0053$ ($R^2 = 1$) que corresponde a la curva de calibración del azul tripán (Fifura1-3) propuesta anteriormente por un estudio similar (Taype, 2015).

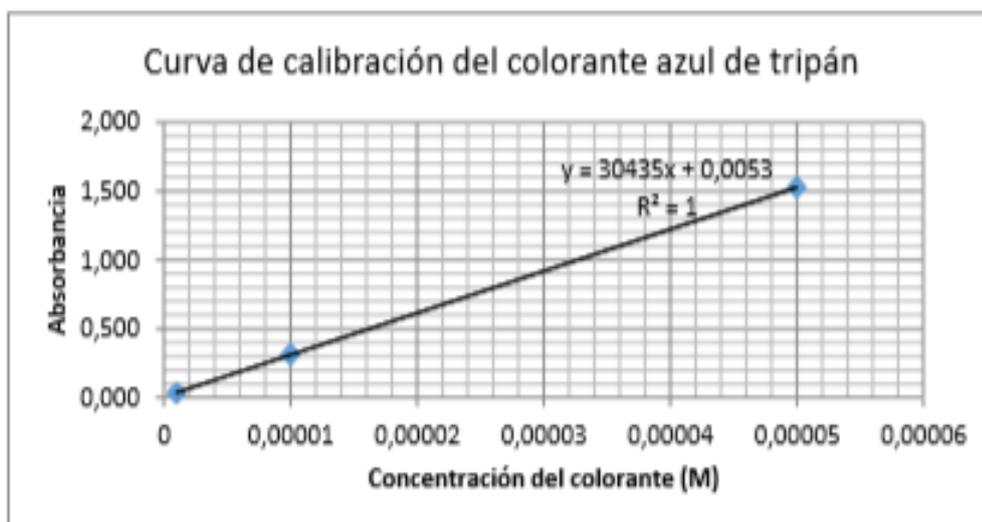


Figura1-3: Curva de calibración del colorante azul Tripán en formamida
Fuente: (Taype, 2015)

Tabla 16-3: Resultados del Método CAM-TBS de los controles y de los extractos de *Lippia scorodonioides*

Grupo experimental	Concentración	Cantidad de colorante absorbido	Clasificación
NaOH 0.1M*	0.1 M	0.470 ± 0.090	Irritante severo
Agua destilada**		0.017 ± 0.001	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	62.5 ppm	0.015 ± 0.004	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	125 ppm	0.010 ± 0.003	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	250 ppm	0.012 ± 0.001	No irritante
<i>Lippia scorodonioides</i>	500 ppm	0.005 ± 0.007	No irritante

* Control Positivo

**Control Negativo

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

El método CAM-TBS, se caracteriza por utilizar el colorante azul de tripán como un medio de contraste para diferenciar células vivas y muertas, mediante la cuantificación de la cantidad de azul tripán absorbida por parte de la membrana corioalantoidea dañada (Lagarto et al., 2006, pp.699-702). La cantidad de colorante absorbido, al exponer a la membrana a NaOH 0.1M (control positivo) fue de 0.470 ± 0.090 puntuación que de acuerdo a (García et al., 2004, pp. 103-107), se clasifica como Irritante severo. En el caso del agua destilada (control negativo) presentó una puntuación de 0.017 ± 0.001 , indicando que es una sustancia No

Irritante. Al evaluar los extractos de *Lippia scorodonioides* a concentraciones de 62.5, 125, 250, 500 ppm se obtuvo una cantidad de colorante absorbido de 0.015 ± 0.004 , 0.010 ± 0.003 , 0.012 ± 0.001 , 0.005 ± 0.007 respectivamente, indicando que el extracto no es irritante en todos los casos. No se ha reportado estudios semejantes para *Lippia scorodonioides*, ni para otras especies del mismo género, sin embargo, en el estudio realizado por (Mansur et al., 2016, pp.251-258), para extractos de plantas coincide con los resultados obtenidos en esta determinación.

3.12 Ensayo de Genotoxicidad

El ensayo de genotoxicidad se realizó mediante la prueba de micronúcleos utilizando semillas de *Vicia faba*, después de 7 días de germinación, que detecta rotura cromosómica para determinar el potencial genotóxico del extracto de *Lippia scorodonioides*, luego de aplicar el tratamiento se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 16-3):

Tabla 17-3: Resultados del Ensayo de Genotoxicidad de los controles y del extracto de *Lippia scorodonioides* en raíces de las células de *Vicia faba* a las 48H

Grupo experimental	Concentración	Micronúcleos Índice	
		(MCN)	mitótico (MI)
Etanol*		2.25 ± 1.26	2.75 ± 1.71
Agua de grifo**		0.5 ± 0.57	27.25 ± 4.5
<i>Lippia scorodonioides</i>	(0,05% p/v)	0	20.75 ± 1.71
<i>Lippia scorodonioides</i>	(0,10% p/v)	0	16.75 ± 1.26
<i>Lippia scorodonioides</i>	(0,20% p/v)	0	18.5 ± 2.08
<i>Lippia scorodonioides</i>	(0,40% p/v)	0	21 ± 1.83

* Control Positivo

**Control Negativo

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Las raíces tratadas con etanol (control positivo), presentaron una disminución en la división celular traduciéndose a un índice mitótico de $2,75 \pm 1,71$ y la aparición de micronúcleos en las células con un índice de 2.25 ± 1.26 , lo que da a notar que es un agente mutagénico que afecta la formación de la placa metafásica y del huso mitótico, estos resultados se deben a que los grupos OH presentan genotoxicidad (Alborghetti et al., 2015, pp.21-26). Los resultados obtenidos por el control negativo presentaron un índice de micronúcleos bajo, pudiendo ser resultado de la utilización del agua de grifo, el cual posee ciertos metales pesados y sales disueltas que influyeron en la determinación, mientras que el índice mitótico

no se vio afectado presentando un resultado mayor que por el control positivo, por lo tanto, no detuvo la división celular. Los meristemas de las raíces expuestas al extracto de *Lippia scorodonioides* a diferentes concentraciones presentó resultados similares al control negativo, en donde se puede evidenciar que el índice mitótico se encuentra en un rango de 20-27, por otra parte en los extractos no se observó la presencia de micronúcleos, esto se debe a que dentro de sus componentes ninguno tienen la capacidad de causar daños a nivel genético, los resultados se asemejan a los reportados en una investigación realizada a *Lippia graveolens* (Avila-Aceved, et al., 2017, pp 72-81), dando como resultado que los extractos no muestran diferencia significativa a comparación con el control negativo, por lo tanto no pueden considerarse como mutágenos.

3.12.1 Análisis estadístico de datos

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos del índice mitótico y del índice de micronúcleos reportados por los controles positivo, negativo y el extracto de *Lippia scorodonioides* a concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500 ppm. Se aplicó el test de Kolmogórov-Smirnov para determinar si los datos pertenecían a una distribución normal. En el caso del índice de micronúcleos como en el índice mitótico se obtuvo un nivel de significancia de (0.000) que es menor a 0.05, lo que nos indica que no presenta una distribución normal de los datos. Con esta información se aplicó el test de Chi cuadrado, que nos permite observar si existen diferencias entre los grupos de tratamiento:

Tabla 18-3: Test de Chi cuadrado para el índice mitótico de los controles y el extracto de *Lippia scorodonioides*

	Value	Df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	511,426 ^a	10	,000
Likelihood Ratio	160,209	10	,000
Linear-by-Linear Association	,742	1	,389
N of Valid Cases	428		

a. 12 cells (66,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,28.

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

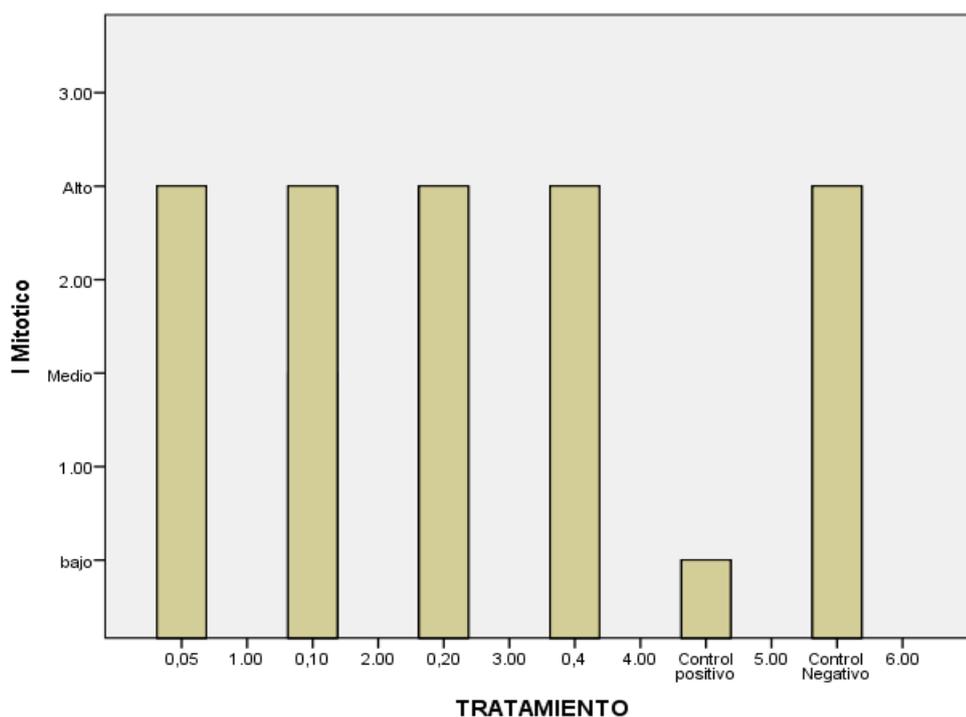


Gráfico 8-3: Gráfico del índice mitótico del extracto de *Lippia scorodonioides* y los controles
Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Planteamiento de las hipótesis

Ho: No existe diferencia en el desarrollo del índice mitótico entre las distintas concentraciones del extracto de *Lippia scorodonioides* y los controles ($p \geq 0.05$)

H1: Existe diferencia en el desarrollo del índice mitótico entre las distintas concentraciones del extracto de *Lippia scorodonioides* y los controles ($p \leq 0.05$)

Decisión:

Existen argumentos para aceptar Ho, debido a que el nivel de significancia obtenido es mayor a 0.05 (0.389). Por lo tanto No existe diferencia significativa en el desarrollo del índice mitótico entre las distintas concentraciones del extracto de *Lippia scorodonioides*, control negativo y el control positivo.

Como se puede observar en el Gráfico 8-3. No existe una gran diferencia en los resultados obtenidos por las muestras del extracto de *Lippia scorodonioides*, control negativo y el control positivo es el único que difiere entre los demás tratamientos

Tabla 19-3: Test de Chi cuadrado para el índice de micronúcleos de los controles y el extracto de *Lippia scorodonioides*

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	1398,782a	75	,000
Likelihood Ratio	1000,012	75	,000
Linear-by-Linear Association	110,855	1	,000
N of Valid Cases	428		

a. 54 cells (56,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,03.

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

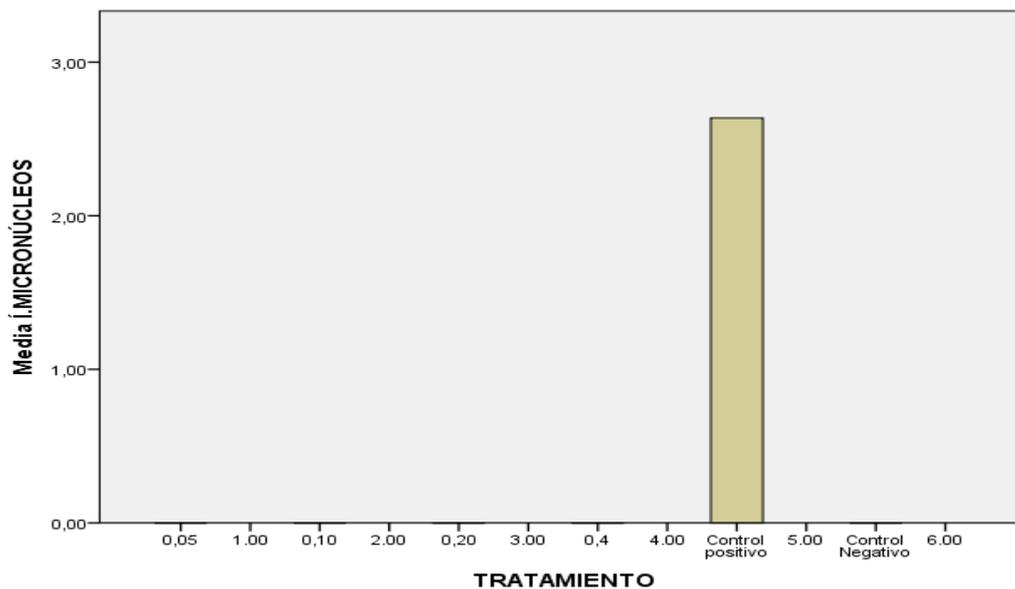


Gráfico 9-3: Gráfico del índice de micronúcleos del extracto de *Lippia scorodonioides* y los controles

Realizado por: Guaita, Mayra, 2018

Planteamiento de las hipótesis

Ho: No existe diferencia en el desarrollo del índice de micronúcleos entre las distintas concentraciones del extracto de *Lippia scorodonioides* y el control positivo ($p \geq 0.05$)

H1: Existe diferencia en el desarrollo del índice de micronúcleos entre las distintas concentraciones del extracto de *Lippia scorodonioides* y el control positivo ($p \leq 0.05$)

Decisión:

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede desechar H_0 , debido a que el nivel de significancia obtenido es menor a 0.05 (0.00). Por lo tanto, se puede decir estadísticamente que existe diferencia significativa en el desarrollo del índice de micronúcleos entre las distintas concentraciones del extracto de *Lippia scorodonioides* y el control positivo.

Como se puede observar en el Gráfico 9-3. Hay una gran diferencia en los resultados obtenidos por el control positivo en relación al control negativo y las muestras del extracto de *Lippia scorodonioides*, ya que solamente en el control positivo existe presencia de micronúcleos mientras que no hay evidencia de estos en las demás muestras.

CONCLUSIONES

1. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* presenta una cierta evidencia de actividad fotoprotectora, según el ensayo de muerte celular inducida sobre *Escherichia coli*, aunque estadísticamente si existe diferencia significativa respecto a los controles positivos, por lo que no puede reemplazar completamente a los compuestos que comúnmente se emplea en las formulaciones comerciales, sin embargo, puede ser empelado adicionalmente a la formulación con el propósito de potenciar la actividad fotoprotectora.
2. Se determinó el factor de protección solar (FPS) *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*, de etilhexil metoxicinamato (OMC) y octildimetil-PABA (pamidato O) a una concentración de 10 ppm, a través espectrofotometría utilizando la ecuación de Mansur. El extracto de las hojas de *Lippia scorodonioides* presentó un menor factor de protección (FPS) *in vitro* a comparación de los controles a la misma concentración.
3. Mediante el ensayo del HET-CAM y CAM-TBS, se determinó la capacidad de irritación ocular producida por el extracto de *Lippia scorodonioides* a diferentes a concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500 ppm empleando como control positivo Etanol y como control negativo Agua destilada. Los resultados fueron favorecedores y el extracto de *Lippia scorodonioides* se clasificó como no Irritante de acuerdo a N.P.Luepke (N.P.Luepke, 1985, pp.287-291). Por lo tanto, se garantiza que es seguro aplicar el extracto en formulaciones sin riesgo de causar irritación ocular.
4. El extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* presentó una capacidad de inducir genotoxicidad menor que la del control positivo, incluso a su máxima concentración que fue de 500 ppm. Por lo tanto, se determinó que el extracto de *Lippia scorodonioides* no induce genotoxicidad, complementando de esta manera a la prueba de irritación ocular. Estas pruebas de seguridad, sugieren que el extracto puede ser incluido en formulaciones, sin riesgo de causar daños a la salud.

RECOMENDACIONES

Se recomiendo utilizar todas las medidas de protección y bioseguridad en el laboratorio, sobre todo al realizar el ensayo de irradiación UVB, ya que se trabaja directamente con bacterias.

Previo a la determinación de la capacidad antioxidante es importante la estabilización del radical DPPH* en oscuridad y midiendo cada 30 minutos en el espectrofotómetro hasta que la medición se encuentre dentro del rango establecido para la determinación, asegurando así resultados confiables al término del ensayo.

En la preparación de la suspensión bacteriana es recomendable realizarlo con bacterias que se encuentren en fase exponencial dentro de la curva de crecimiento bacteriano, ya que permite obtener colonias de gran tamaño, de lo contrario se obtendrían datos erróneos que podrían ocurrir por que las bacterias se encuentren en fase inicial de crecimiento o en fase de latencia o de muerte celular lo que se traduciría en una disminución en el crecimiento bacteriano.

En el ensayo de muerte celular inducida es necesario obtener una suspensión bacteriana homogénea es decir sin agregados celulares, además se debe realizar un pipeteo adecuado durante todo el ensayo, para obtener una correcta distribución en el crecimiento de las bacterias y sea fácil el conteo de UFC sobrevivientes.

Se recomienda utilizar los huevos fecundados e incubados entre el día 9-10, de lo contrario su fecundación estaría avanzada y por razones éticas no se debe llevar a cabo el ensayo.

En el ensayo de genotoxicidad es importante realizar cortes muy finos de las raíces para observar con mayor claridad las células en el microscopio.

Se recomienda continuar con la investigación de *Lippia scorodonioides*, ya que no existen estudios realizados a esta especie, con el objetivo de determinar otras actividades en las que pudiese destacarse.

Motivar la investigación farmacognósica y fitoquímica de especies propias de los Andes ecuatorianos sobre todo por su altitud y frecuente exposición a la radiación UV desarrollan metabolitos que resultan ser beneficiosos para el ser humano, fomentando de esta manera a la investigación científico

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO, J.G.et al. Photoprotective activity of Buddleja scordioides. *Fitoterapia* [en línea], 2005, 76, pp. 301-309. [Consulta: 21 mayo 2018]. ISSN 3-4. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X05000535?via%3Dihub>.

AJELLO, Gloria & WELLS, Joy,. *Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad de los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de importancia para la Salud Pública en el mundo en desarrollo* [en línea]. 2004. [Consulta: 21 mayo 2018] S.l.: s.n. Disponible en: https://issuu.com/laboratorio_hu/docs/manual__de_laboratorio_para_la_identificacion__y_p/311.

ALBORGHETTI, OLIVEIRA, M.C. de, TAVARES, G. de O., PEREIRA, L.F.F., SOARES, N.D.S.L. y SILVA, P.G.,. Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. *Brazilian Journal of Anesthesiology (Edición en Español)* [en línea], 2015, 65(1), pp. 21-26. [Consulta: 23 mayo 2018]. ISSN 22554963. DOI 10.1016/j.bjanes.2013.07.008. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2255496313001803>.

ANDRE, B., BERGMANSON, J., BUTLER, J.J., CHOU, B.R., GODAR, D., GOOD, G., POPE, S.J. y SLINEY, D. El ojo y la radiación solar Ultravioleta. [en línea], 2015, [Consulta: 23 mayo 2018]. Disponible en: [http://www.pointsdevue.com/sites/default/files/el-ojo-y-la-radiacion-solar-ultravioleta.pdf?utm_source=Website&utm_campaign=White Papers The eye and solar ultraviolet radiation ESP&utm_medium=PDF](http://www.pointsdevue.com/sites/default/files/el-ojo-y-la-radiacion-solar-ultravioleta.pdf?utm_source=Website&utm_campaign=White%20Papers%20The%20eye%20and%20solar%20ultraviolet%20radiation%20ESP&utm_medium=PDF).

ARCSA. Listado de Plantas Medicinales del Ecuador realizada a partir de revisiones bibliográficas. *Agencia Nacional De Regulación, Control Y Vigilancia Sanitaria Dirección De Certificaciones* [en línea], 2015, [Consulta: 23 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/08/listado-de-plantas-medicinales-del-ecuador-24-07-2015.pdf>.

ATCC. *ATCC. (American Type Culture Collection)* [en línea], 2016, [Consulta: 5 abril 2018] S.l.: s.n. Disponible en: https://www.atcc.org/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx.

AVILA-ACEVED, et al.. Lippia graveolens photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2017, 167, pp. 72-81. [Consulta: 5 abril 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416308922>.

AZCONA, L. Fotoprotección y dermatosis. *Farmacia Profesional* [en línea], 2005, 19(7), pp. 50-55. [Consulta: 5 abril 2018] Disponible en: <http://www.elsevier.es/pt-revista-farmacia-profesional-3-articulo-fotoproteccion-dermatosis-13077361>.

BATLLE, C. Factor de protección solar. 2005 , vol. 24.

BECTON. Patrón de turbidez BBL preparado McFarland Turbidity Standard No. 0.5. *Bd* [en línea], 2005, pp. 3. [Consulta: 5 abril 2018] Disponible en: [http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)_es.pdf](http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf).

BERK, Z. Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration. *Food Process Engineering and Technology (Third Edition)* [en línea], 2018, 3, pp. 567-581. [Consulta: 10 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128120187000233>.

BERMEJO DE ZAA, et al. Determinación de parámetros químico- físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de. [en línea], 2014, 13 (5), pp. 670-680. [Consulta: 10 abril 2018].ISSN 1729-519X. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revhabciemed/hcm-2014/hcm145d.pdf>.

CABRERA MORALES, L.-N. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología* [en línea], 2006, 29(7) [Consulta: 10 abril 2018]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-01082004000100003&script=sci_arttext&tlng=es.

CÁRDENAS ALEXIS NOVOA, A.P.M. Evaluación de antioxidantes a partir de las hojas, flores y tallos de la especie *Lippia dulcis* Trev. (MENTA DULCE) [en línea] (tesis). (Maestría), Universidad Nacional De La Amazonía Peruana. 2016. [Consulta: 10 abril 2018]. Disponible en: http://repositorio.unapikitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4110/Alexis_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

CARLOS SORDO, C.G. Cáncer de piel y radiación solar: experiencia peruana en la prevención y detección temprana del cáncer de piel y melanoma. *Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [en línea], 2013, 30 (1), pp. 113-117. [Consulta: 15 abril 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=59518491008>.

CEFALI LC , A. et al. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science* [en línea], 2016, 38 (4), pp. 1-8. [Consulta: 15 abril 2018] DOI 10.1111/ics.12316. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26919163>.

CERÓN, C.E., ALFREDO, H. y QAP, P. Plantas comunes del Zoológico de Guayllabamba. [en línea], 2015, [Consulta: 16 abril 2018]. Disponible en: http://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/659_zoologicoguayllabamba_b1.pdf.

CHICHIZOLA, C. Disruptores Endocrinos. Efectos en la Reproducción. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* [en línea], 2003, 40 (3), pp. 172-188. [Consulta: 16 abril 2018]. ISSN 03264610. Disponible en: <http://www.raem.org.ar/numeros/2003-vol40/numero-03/3chichizola.pdf>.

CORREA K. Relación Entre Las Posturas Ergonómicas Y Las Futuras Enfermedades Ocupacionales De Los Estudiantes De Quinto Año De La Carrera De Odontología De La Universidad Católica De Cuenca. [en línea] (tesis).(Trabajo) UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA. 2016. [Consulta: 17 abril 2018]. Disponible en: http://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/reducacue/7164/1/TRABAJO_DE_TITULACION_CORREA_CARRERA_KATHERINE_ELIZABETH.pdf.

COSTA SÔNIA, C.B.D. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2015, 25(4), pp. 413-418. [Consulta: 16 abril 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X15001349>.

DE OLIVEIRA, R.G., et al. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro. *Journal of Young Pharmacists* [en línea], 2013, 5 (3), pp. 102-105. [Consulta: 17 abril 2018]. ISSN 09751483. DOI 10.1016/j.jyp.2013.08.005. Disponible en: http://www.jyoungpharm.org/sites/default/files/10.1016_j.jyp_.2013.08.005.pdf.

DIAZ PLASENCIA JUAN, TANTALEAN – RAMELLA ENRIQUE, G.P.C. Cáncer de piel no melanoma: aspectos clínicos - patológicos. *Revista Medica de Heredia Lima* [en línea], 1995, 6(2), pp. 83-92. [Consulta: 17 abril 2018] DOI <http://dx.doi.org/10.20453/rmh.v6i2.495>. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v6n2/v6n2ao4.pdf>.

EL COMERCIO, 2016. RADIACIÓN UV ES UN RIESGO EN ECUADOR. ,

EL COMERCIO. Altos índices de radiación UV en Quito y ciudades de altura este 13 de marzo. [en línea], 2018, [Consulta: 16 abril 2018] Disponible en: <http://www.elcomercio.com/actualidad/quito-indices-radiacionuv-equinoccio-inamhi.html>.

EL HAJJOUJI H1, PINELLI E, GUIRESSE M, MERLINA G, REVEL JC, H.M. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. [en línea], 2007, 634(1-2), pp. 25-31. [Consulta: 18 abril 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851113>.

ESTILITA, E., 2005. Fotoprotección. , 24(5).

EUCERIN. Luz solar. [en línea]. 2018. [Consulta: 18 abril 2018] Disponible en: <https://www.eucerin.com.ec/about-skin/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/sol-y-piel>.

EXA. AGENCIA ESPACIAL CIVIL ECUATORIANA PUBLICA EL INFORME HIPERIÓN: ECUADOR, COLOMBIA Y PERÚ RECIBEN LA MAYOR DOSIS DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA DEL PLANETA. [en línea], 2008, [Consulta: 18 abril 2018]. Disponible en: <http://www.exa.ec/bp21/index-es.html>.

FABRI, NOGUEIRA MS, MOREIRA JDOS R, BOUZADA ML, S.E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of Lippia species by bioautography. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD* [en línea], 2001,14(7-8), pp. 840-846. [Consulta: 18 abril 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476886>.

FARIBORZTAGHIPOUR. Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation. *Water Research* [en línea], 2004, 38(18), pp. 3940-3948. [Consulta: 19 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135404003434?via%3Dihub>.

FARMACOGNOSIA. *Métodos de análisis de la droga* [en línea]. 2008. [Consulta: 19 abril 2018]. Disponible en: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/métodos-de-análisis-de-droga/determinación-de-cenizas/>.

GARCÍA, L, GLEIBY, M, MONTES DE OCA, N. y H. Estudio de la irritación ocular y dérmica de Pochonia chlamydosporia var. catenulata. *Toxicología* [en línea], 2004, 21(2-3), pp. 103-107. [Consulta: 19 abril 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91921308>.

GASQUET, H. Conversión de la luz solar en Energía Eléctrica: Manual Teórico y Práctico sobre los sistemas Fotovoltaicos. *Conversión de la luz solar en energia Electrica: Manual teorico y práctico*. [en línea], 2004, 52(90), pp. 196. [Consulta: 19 abril 2018]. Disponible en: <http://www.solartronic.com/download/SistemasFV.pdf>.

GILABERTE Y. et al. Fotoprotección. *Actas Dermosifiliogr* [en línea], 2003, 94(5), pp. 271-293. [Consulta: 20 abril 2018]. Disponible en:

<http://www.actasdermo.org/es/fotoproteccion/articulo/13048173/>.

GILCHREST BA, et al. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *The New England Journal of Medicine* [en línea], 1999, 340(17), pp. 1341-1348. [Consulta: 20 abril 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219070>.

GOKHANZENGIN, ADRIANOMOLLICA, A. In vitro and in silico insights of Cupressus sempervirens, Artemisia absinthium and Lippia triphylla: Bridging traditional knowledge and scientific validation. *European Journal of Integrative Medicine* [en línea], 2017, 12, pp. 135-141. [Consulta: 20 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876382017301087>.

GONZÁLEZ-PÚMARIEGA, et al. La Radiación Ultravioleta. Su Efecto Dañino Y Consecuencias Para La Salud Humana. *Theoria* [en línea], 2009, 18(2), pp. 69-80. [Consulta: 20 abril 2018]. Disponible en: <http://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/194/v/v18-2/06.pdf>.

GUTIÉRREZ, V. Cáncer de piel. [en línea], 2003, 46(4), pp. 166-171. [Consulta: 28 abril 2018] Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-4/RFM46411.pdf>.

GUIJA, E., INOCENTE, M., PONCE, J. y ZARZOSA, E. Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico* [en línea], 2015, 2(1), pp. 0-4. [Consulta: 20 abril 2018] Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf>.

GUZMÁN, R.B.A. y TELLO, R.A.Q. Asociación entre el nivel de radiación solar ultravioleta y la incidencia de lesiones dermatológicas actínicas agudas en el hospital vicente corral moscoso durante 2011 y 2014 [en línea], 2012, [Consulta: 20 abril 2018]. Disponible en: [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25575/1/PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25575/1/PROYECTO_DE_INVESTIGACION.pdf).

H.J. VAN DER RHEE, E. DE VRIES, J.W.C. La exposición al sol regular beneficia a la salud. *Hipótesis Médicas* [en línea], 2016, 97, pp. 34-37. [Consulta: 20 abril 2018]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987716303966>.

HOFFMANN K, LAPERRE J , AVERMAETE A , ALTMAYER P, G.T. Protección UV definida por textiles de indumentaria. *Dermatología* [en línea], 2001, 137(8), pp. 1089-1094. [Consulta: 20 abril 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11493104>.

KARINA CAÑARTE. Radiación Ultravioleta y su efecto en la Salud. [en línea], 2010,. 3(4). Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/153/157>.

KINUTHIA, MURIITHI AW, M.P. Freeze dried extracts of *Bidens biternata* (Lour.) Merr. and Sheriff. show significant antidiarrheal activity in in-vivo models of diarrhea. *Ethnopharmacol.* [en línea], 2016, [Consulta: 21 abril 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664442>.

KLITGAARD, B.B., MERINO, B., LOZANO, P., DELGADO, T. y ELIZALDE, F. *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador* [en línea]. 2018. [Consulta: 21 abril 2018] Disponible en: <http://www.tropicos.org/specimen/2660285?projectid=2>.

KOLLIAS YH MALALLAH H. AL-AJMI A. BAQER BE JOHNSON, S.G. Espectros de acción de eritema y melanogénesis en individuos muy pigmentados en comparación con caucásicos de piel blanca. *Fotodermatología* [en línea], 1996, 12(5). [Consulta: 21 abril 2018]. Disponible en: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1537-2995.1991.31992094675.x/asset/j.1537-2995.1991.31992094675.x_p1.png?v=1&s=0ed448734db212c7931a4b2ecf1bbf4a1084ff9b.

KONEMAN, E.; et al. Diagnóstico Microbiológico. 6^a ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana SA, 2006. pp. 932-933

KRAUSE, H et al., Presence of benzophenones commonly used as UV filters and absorbers in paired maternal and fetal samples. *Environment International* [en línea], 2018, 110, pp. 51-60. [Consulta: 21 abril 2018] Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412017306815>.

LA HORA. Se dispara el cáncer de piel. [en línea], 2011, [Consulta: 21 abril 2018] Disponible en: <https://lahora.com.ec/noticia/1101165661/se-dispara-el-cancer-de-piel>.

LAGARTO, VEGA R, et al.,. In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicology in Vitro* [en línea], 2006, 20(5), pp. 699-702. [Consulta: 22 abril 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29630288>.

LANA RABINOVICH, V. Herbal Sun Protection Agents: Human Studies. *Clinics in Dermatology* [en línea], 2018, [Consulta: 22 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X18300555>.

LIMÓN Daniel, et al.,. LOS FLAVONOIDEOS: MECANISMO DE ACCIÓN, NEUROPROTECCIÓN Y EFECTOS FARMACOLÓGICOS. [en línea], 2010, 34. [Consulta: 22 abril 2018] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/259344548_LOS_FLAVONOIDEOS_MECANISMO_DE_ACCION_NEUROPROTECCION_Y_EFECTOS_FARMACOLOGICOS.

LÓPEZ, M. et al.,. P53, Un Gen Supresor Tumoral. *Gaceta Médica de Bilbao*, [en línea], 2001, 98(1), pp. 21-27. [Consulta: 22 abril 2018] ISSN 03044858. DOI 10.1016/S0304-4858(01)74350-8.

LORIGO, M. Photoprotection of ultraviolet-B filters: Updated review of endocrine disrupting properties. *Steroids* [en línea], 2018, 131, pp. 46-58. [Consulta: 23 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X1830014X>.

LUENGO, M.T.L. Fitoterapia y protección solar. *Farmaci Profesional* [en línea], 2015, 29(3), pp. 29-31. [Consulta: 23 abril 2018] . Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-fitoterapia-proteccion-solar-X0213932415346374?referer=buscador>.

MANSUR, MARIA CRISTINA P.P.REIS, et al., In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2016,26(2), pp. 251-258. [Consulta: 23 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X16000041>.

MARK E. BURNETT JUDY & HU STEVEN Q. WANG. Sunscreens: Obtaining adequate photoprotection. *Dermatologic Therapy* [en línea], 2012,. 25(3), pp. 244. [Consulta: 23 abril 2018] Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>.

MARKEL et al. Inmovilización de Quercetina sobre resina de Merrifield mediante Síntesis Orgánica en Fase Sólida asistida por microondas. Estudio preliminar de la retención de Pb(II). *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* [en línea], 2017, 29(2), pp. 1. [Consulta: 23 abril 2018] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002006000300003&script=sci_arttext%5Cnhttp://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002006000300003&script=sci_arttext.

MARTÍNEZ- et al., Alternativas a La Experimentación Animal En Toxicología: Situación Actual. *Acta bioethica* [en línea], 2007,13(1), pp. 41-52. [Consulta: 23 abril 2018]. ISSN 07175906. DOI 10.4067/S1726-569X2007000100005. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/abioeth/v13n1/art05.pdf>.

MARTÍNEZ, I.O. *Evaluación ecotoxicológica de filtros ultravioleta en invertebrados. Análisis de los efectos celulares en el insecto acuático Chironomus riparius* [en línea]. 2014, [Consulta: 23 abril 2018] S.l.: Universidad Nacional de Educación a Distancia. Disponible en: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/tesisuned:Ciencias-Iozaez/OZAEZ_MARTINEZ_Irene_Tesis.pdf.

MARTÍNEZ, P. *La curva del crecimiento bacteriano.* [en línea]. 2014. [Consulta: 23 abril 2018] S.l.: s.n. Disponible en: <https://pompiliomartinez.wordpress.com/2014/07/02/la-curva-del-crecimiento-bacteriano/>.

MARTINS, F. et al.,. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2016, 161, pp. 34-39. [Consulta: 24 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416303554>.

MEDRÁN, M. Muerte celular . Apoptosis y otras formas alternativas de muerte celular . [en línea], 2008, [Consulta: 24 abril 2018] Disponible en: http://patogfesc.weebly.com/uploads/6/9/4/8/69488793/formas_de_muerte_celular.pdf.

MEGWATSON, D. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Seminars in Oncology Nursing* [en línea], 2016, 32(3), pp. 241-254. [Consulta: 24 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208116300249>.

MENSOR LL, E. et al.,. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. [en línea],2001, 15(2), pp. 127-130. [Consulta: 24 abril 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268111>.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. El 30 a 40% de casos de cáncer podrían evitarse si se cambian cinco malos hábitos. [en línea]. 2013. [Consulta: 24 abril 2018] Disponible en: <http://somossalud.msp.gob.ec/somossalud/index.php/enterate/200-el-30-a-40-de-casos-de-cancer-podrian-evitarse-si-se-cambian-cinco-malos-habitos>.

MIRANDA M., 2000. Folleto de F armacognosia y Productos Naturales. ,

MORATAYA M. Caracterización Farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), Orégano (*Lippia graveolens*), Salvia sija (*Lippia alba*) y Salviyá (*Lippia chiapasensis*). [en línea], 2006, [Consulta: 25 abril 2018] Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2389.pdf.

MURILLO G et al. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. *Toxicología* [en

línea], 2003, 20, pp. 187-192. [Consulta: 25 abril 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/919/91920305/>.

N.P.LUEPKE. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* [en línea], 1985, 23(2), pp. 287-291. [Consulta: 26 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0278691585900304>.

NORIEGA, P. Riesgos de una exposición prolongada al sol. [en línea], 2012, [Consulta: 26 abril 2018] Disponible en: <https://www.elsevier.es/corp/conecta/medicina/riesgos-de-una-exposicion-prolongada-al-sol/>.

OCHOA A. et al. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea], 2013, 44(1), pp. 52-59. [Consulta: 26 abril 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=11116271007>.

OLARTE, M., et al. Daño y respuesta celular en piel por exposición prolongada a radiación UV. *Revista ANACEM* [en línea], 2016, 9(2), pp. 44-52. [Consulta: 26 abril 2018]. Disponible en: <http://www.revistaanacem.cl/wp-content/uploads/2016/11/10.-2015-9-1-AR1.pdf>.

OMS. ÍNDICE UV SOLAR MUNDIAL GUÍA PRÁCTICA. *Small* [en línea], 2003, pp. 9-10. [Consulta: 27 abril 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/uv/publications/en/uvispa.pdf>.

ORBEGOSO, R, et al. Citotoxicidad y genotoxicidad de las aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante el bioindicador ambiental *Vicia faba* L. *Scientia Agropecuaria* [en línea], 2017, 8(3), pp. 203-213. [Consulta: 27 abril 2018]. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1555/1580>.

PASCUAL, P, et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2001, 76(3), pp. 201-214. [Consulta: 27 abril 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101002343>.

PHIL, U. 253. VERBENACEAE Adans. *Candollea* [en línea],2011, pp. 2-46. [Consulta: 27 abril 2018] Disponible en: <http://www.floraargentina.edu.ar/publicaciones/VERBENACEAE.pdf>.

PIQUERO, J. Mecanismos moleculares de la comedogénesis. *Dermatología* [en línea], 2015. [Consulta: 27 abril 2018].Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:RaSBKbnCRq0J:www.un.org/esa/sustdev/natlinfo/indicators/factsheet.pdf+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=gh>.

R.ROVER, MARJORIE, R.C.B. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [en línea], 2013, 104, pp. 366-371. [Consulta: 28 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237013001411>.

RADICE, M, et al. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia* [en línea], 2016, pp. 144-162. [Consulta: 28 abril 2018]Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27642040>.

RAMÍREZ, A. , et al.,. Escherichia coli. [en línea], 2010, pp. 1-14. [Consulta: 28 abril 2018] Disponible en: <http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/escherichia-coli-i.pdf>.

RODRIGUEZ, S. Escala de Mc Farland. [en línea].2010. [Consulta: 28 abril 2018] Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>.

ROJAS, A. Conceptos y práctica de microbiología general. ,2011, pp. 46-47.

RP, ARALDI, DE MELO TC, N.B. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. [en línea], 2015, 72, pp. 74-82. . [Consulta: 28 abril 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26054678>.

RUALES, C. *Estudios para la recuperación de la flora nativa en el valle de Tumbaco-Distrito Metropolitano de Quito. Inventario florístico y ensayo de la propagación vegetativa* [en línea]. 2007. [Consulta: 28 abril 2018] Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/15209594/84737/168>.

SALAS, M . Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO) [en línea] (tesis). (Licenciado en Biología) UNIVERSIDAD RICARDO PALMA. [Consulta: 28 abril 2018].Disponible en: http://cybertesis.urp.edu.pe/bitstream/urp/832/1/Salas_mc.pdf.

SALAZAR, C.H. *La radiación Ultravioleta y el índice de Radiación Ultravioleta (IUV)* [en línea]. [Consulta: 28 abril 2018]. Disponible en: <http://docplayer.es/2033344-La-radiacionultravioleta-y-el-indice-de-radiacion-ultravioleta-iuv.html>.

SHASHANK KUMAR, A.K.P. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* [en línea], 2013, pp. 16. [Consulta: 28 abril 2018].Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>.

SOARES DOS REIS, G. , et al. Preparation of a sunscreen and evaluation of the photoprotective action of the green propolis from Vale do Aço, Minas Gerais, Brazil. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* [en línea], 2009, 8(4), pp. 282-288. [Consulta: 28 abril 2018] ISSN 07177917. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85611265008.pdf>.

SOLCA. Tasas Estandarizadas de los principales tipos de cáncer según residentes Guayaquil 2010. [en línea], 2010, [Consulta: 28 abril 2018] Disponible en: <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/reportes/Grafico1-1.jsp>.

SUSANNENEUGART, SUSANNEBALDERMANN, F.S.H.-R. The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia Horticulturae* [en línea], 2018, 233, pp. 460-478.[Consulta: 28 abril 2018].Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423817307616>.

SVOBODOVÁ, A., PSOTOVÁ, J. y WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* [en línea], 2003, 147(2), pp. 137-145. [Consulta: 29 abril 2018].ISSN 12138118. DOI 10.5507/bp.2003.019. Disponible en: <http://biomed.papers.upol.cz/pdfs/bio/2003/02/03.pdf>.

TAYPE, E. Estandarización y validación del método HET CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética [en línea] UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 2015. [Consulta: 29 abril 2018]Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4474/1/Taype_ee.pdf.

THE SKIN CANCER FOUNDATION. Protector Solar: Acerca del Protector Solar. [en línea],2017, [Consulta: 29 abril 2018] Disponible en: <http://www.cancerdepiel.org/prevencion/proteccion-solar/protector-solar-acerca-del-protector-solar>.

‘USP 35 FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA’ .

VALLEJO, N , et al. Perspectiva genética de los rayos UV y las nuevas alternativas de protección solar. *Dermatología* [en línea], 2013, 94(3), pp. 1. [Consulta: 29 abril 2018].Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-57042009000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=es%5Cnhttp://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-57042009000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

VEGA, M.V.S. La capa de Ozono. *Biocenosis* [en línea], 2008, 21, pp. 23. [Consulta: 29 abril 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/31175/introduccionCapadeOzono.pdf>.

WHO. INTERSUN: the global UV project: a guide and compendium. *World Health*

Organization [en línea],2003, [Consulta: 29 abril 2018] Disponible en: <http://www.who.int/uv/publications/en/Intersunguide.pdf>.

YOKOWATANABE, H, et al. Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* [en línea],2015, 282(2,15), pp. 119-128. [Consulta: 29 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X14004347>.

YOUNG, ANTONY, JOËLCLAVEAUMD, A.B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. *American Academy of Dermatology* [en línea],2017, 76(3), pp. S100-S109. [Consulta: 29 abril 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962216308805>.

ZAMBRANO, E.A. *ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y COMPOSICIÓN PROXIMAL DE Cymbopogon citratus (HIERBA LUISA), Melissa officinalis (TORONJIL) Y Lippia citriodora (CEDRÓN) PROVENIENTE DE LAS PROVINCIAS DEL ORO Y AZUAY, ECUADOR* [en línea]. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA.2015. [Consulta: 1 mayo 2018] Disponible en: [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2795/3/CD00000-7-TRABAJO COMPLETO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/2795/3/CD00000-7-TRABAJO%20COMPLETO.pdf).

ANEXOS

Anexo A. Análisis estadístico de la actividad fotoprotectora.

Resultados del área bajo la curva de la supervivencia bacteriana de *E. coli* de la muestra y los controles a 20 ppm

BLANCO	OMC 20	PAMIDATO 20	<i>Lippia scorodonioides</i> 20
780000000 ± 451938325,4	930000000 ± 108512672,1	855060000 ± 127604079,9	750000000 ± 69282032,3
915000000 ± 451938325,4	915000000 ± 108512672,1	990120000 ± 127604079,9	870000000 ± 69282032,3
735000000 ± 451938325,4	1110000000 ± 108512672,1	735060000 ± 127604079,9	750000000 ± 69282032,3

Resultados del área bajo la curva de la supervivencia bacteriana de *E. coli* de la muestra y los controles a 200 ppm

BLANCO	OMC 200	PAMIDATO 200	<i>Lippia scorodonioides</i> 200
780000000 ± 451938325,4	1110180000 ± 113275333,6	1155480000 ± 62397298,02	900120000 ± 31258618,01
915000000 ± 451938325,4	885120000 ± 113275333,6	1065360000 ± 62397298,02	915120000 ± 31258618,01
735000000 ± 451938325,4	975180000 ± 113275333,6	1035660000 ± 62397298,02	855060000 ± 31258618,01

Resultados del área bajo la curva de la supervivencia bacteriana de *E. coli* de la muestra y los controles a 2000 ppm

BLANCO	OMC 2000	PAMIDATO 2000	<i>Lippia scorodonioides</i> 2000
780000000 ± 451938325,4	1411320000 ± 135242036,4	1441080000 ± 160488395,8	1020300000 ± 45806152,43
915000000 ± 451938325,4	1531440000 ± 135242036,4	1125840000 ± 160488395,8	1110240000 ± 45806152,43
735000000 ± 451938325,4	1261500000 ± 135242036,4	1231140000 ± 160488395,8	1080360000 ± 45806152,43

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS REALIZADOS A TRAVÉS DEL PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA

Resultados de la prueba de Normalidad del área bajo la curva de la supervivencia bacteriana de *E. coli* de la muestra y controles

	TRATAMIENTO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UFC	BLANCO	,330	3	.	,867	3	,286
	OMC20	,361	3	.	,807	3	,132
	PAMIDATO 20	,182	3	.	,999	3	,935
	Lippia scorodonioides 20	,385	3	.	,750	3	,231
	OMC 200	,219	3	.	,987	3	,781
	PAMIDATO 200	,293	3	.	,922	3	,459
	Lippia scorodonioides 200	,292	3	.	,923	3	,463
	OMC 2000	,196	3	.	,996	3	,879
	PAMITADO 2000	,253	3	.	,965	3	,638
	Lippia scorodonioides 2000	,254	3	.	,964	3	,635

a. Lilliefors Significance Correction

Resultados de la prueba de Tukey HSD^a de los datos del área bajo de la muestra y de los controles

TRATAMIENTO	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
BLANCO	3	589500000,0000		
Lippia scorodonioides 20	3	790000000,0000	790000000,0000	
PAMIDATO 20	3	860080000,0000	860080000,0000	
Lippia scorodonioides 200	3	890100000,0000	890100000,0000	
OMC20	3	985000000,0000	985000000,0000	985000000,0000
OMC 200	3	990160000,0000	990160000,0000	990160000,0000
Lippia scorodonioides 2000	3	1070300000,0000	1070300000,0000	1070300000,0000
PAMIDATO 200	3	1085500000,0000	1085500000,0000	1085500000,0000
PAMITADO 2000	3		1266020000,0000	1266020000,0000
OMC 2000	3			1401420000,0000
Sig.		,054	,072	,158

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Resultados de la prueba de Tukey HSD^a comparación múltiple de los datos del área bajo de la muestra y de los controles Tukey HSD

(I) TRATAMIENT O	(J) TRATA MIENTO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
BLANCO	OMC20	-395500000,00000	141645805,58562	,204	-897083066,2002	106083066,2002	
	PAMIDA TO 20	-270580000,00000	141645805,58562	,663	-772163066,2002	231003066,2002	
	Lippia scorodoni oides 20	-200500000,00000	141645805,58562	,908	-702083066,2002	301083066,2002	
	OMC 200	-400660000,00000	141645805,58562	,192	-902243066,2002	100923066,2002	
	PAMIDA TO 200	-496000000,00000	141645805,58562	,054	-997583066,2002	5583066,2002	
	Lippia scorodoni oides 200	-300600000,00000	141645805,58562	,534	-802183066,2002	200983066,2002	
	OMC 2000	-811920000,00000*	141645805,58562	,000	1313503066,200 2	-310336933,7998	
	PAMITA DO 2000	-676520000,00000*	141645805,58562	,004	1178103066,200 2	-174936933,7998	
	Lippia scorodoni oides 2000	-480800000,00000	141645805,58562	,067	-982383066,2002	20783066,2002	
	OMC20	BLANC O	395500000,00000	141645805,58562	,204	-106083066,2002	897083066,2002
		PAMIDA TO 20	124920000,00000	141645805,58562	,995	-376663066,2002	626503066,2002
Lippia scorodoni oides 20		195000000,00000	141645805,58562	,921	-306583066,2002	696583066,2002	
OMC 200		-5160000,00000	141645805,58562	1,000	-506743066,2002	496423066,2002	
PAMIDA TO 200		-100500000,00000	141645805,58562	,999	-602083066,2002	401083066,2002	
Lippia scorodoni oides 200		94900000,00000	141645805,58562	,999	-406683066,2002	596483066,2002	
OMC 2000		-416420000,00000	141645805,58562	,158	-918003066,2002	85163066,2002	
PAMITA DO 2000		-281020000,00000	141645805,58562	,618	-782603066,2002	220563066,2002	
Lippia scorodoni oides 2000		-85300000,00000	141645805,58562	1,000	-586883066,2002	416283066,2002	

PAMIDATO 20	BLANC O	270580000,00000	141645805,58562	,663	-231003066,2002	772163066,2002
	OMC20	-124920000,00000	141645805,58562	,995	-626503066,2002	376663066,2002
	Lippia scorodonioides 20	70080000,00000	141645805,58562	1,000	-431503066,2002	571663066,2002
	OMC 200	-130080000,00000	141645805,58562	,994	-631663066,2002	371503066,2002
	PAMIDA TO 200	-225420000,00000	141645805,58562	,837	-727003066,2002	276163066,2002
	Lippia scorodonioides 200	-30020000,00000	141645805,58562	1,000	-531603066,2002	471563066,2002
	OMC 2000	-541340000,00000*	141645805,58562	,028	1042923066,2002	-39756933,7998
	PAMITA DO 2000	-405940000,00000	141645805,58562	,180	-907523066,2002	95643066,2002
	Lippia scorodonioides 2000	-210220000,00000	141645805,58562	,883	-711803066,2002	291363066,2002
	Lippia scorodonioides 20	BLANC O	200500000,00000	141645805,58562	,908	-301083066,2002
OMC20		-195000000,00000	141645805,58562	,921	-696583066,2002	306583066,2002
PAMIDA TO 20		-70080000,00000	141645805,58562	1,000	-571663066,2002	431503066,2002
OMC 200		-200160000,00000	141645805,58562	,909	-701743066,2002	301423066,2002
PAMIDA TO 200		-295500000,00000	141645805,58562	,556	-797083066,2002	206083066,2002
Lippia scorodonioides 200		-100100000,00000	141645805,58562	,999	-601683066,2002	401483066,2002
OMC 2000		-611420000,00000*	141645805,58562	,010	1113003066,2002	-109836933,7998
PAMITA DO 2000		-476020000,00000	141645805,58562	,072	-977603066,2002	25563066,2002
OMC 200	BLANC O	400660000,00000	141645805,58562	,192	-100923066,2002	902243066,2002
	OMC20	5160000,00000	141645805,58562	1,000	-496423066,2002	506743066,2002
	PAMIDA TO 20	130080000,00000	141645805,58562	,994	-371503066,2002	631663066,2002
	Lippia scorodonioides 20	200160000,00000	141645805,58562	,909	-301423066,2002	701743066,2002

	PAMIDA TO 200 Lippia scorodoni oides 200 OMC 2000 PAMITA DO 2000 Lippia scorodoni oides 2000	-95340000,00000 100060000,00000 -411260000,00000 -275860000,00000 -80140000,00000	141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562	,999 ,999 ,169 ,640 1,000	-596923066,2002 -401523066,2002 -912843066,2002 -777443066,2002 -581723066,2002	406243066,2002 601643066,2002 90323066,2002 225723066,2002 421443066,2002
PAMIDATO 200	BLANC O OMC20 PAMIDA TO 20 Lippia scorodoni oides 20 OMC 200 Lippia scorodoni oides 200 OMC 2000 PAMITA DO 2000 Lippia scorodoni oides 2000	496000000,00000 100500000,00000 225420000,00000 295500000,00000 95340000,00000 195400000,00000 -315920000,00000 -180520000,00000 15200000,00000	141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562	,054 ,999 ,837 ,556 ,999 ,920 ,469 ,948 1,000	-5583066,2002 -401083066,2002 -276163066,2002 -206083066,2002 -406243066,2002 -306183066,2002 -817503066,2002 -682103066,2002 -486383066,2002	997583066,2002 602083066,2002 727003066,2002 797083066,2002 596923066,2002 696983066,2002 185663066,2002 321063066,2002 516783066,2002
Lippia scorodonioides 200	BLANC O OMC20 PAMIDA TO 20 Lippia scorodoni oides 20 OMC 200 PAMIDA TO 200 OMC 2000 PAMITA DO 2000	300600000,00000 -94900000,00000 30020000,00000 100100000,00000 -100060000,00000 -195400000,00000 -511320000,00000* -375920000,00000	141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562 141645805,58562	,534 ,999 1,000 ,999 ,999 ,920 ,043 ,256	-200983066,2002 -596483066,2002 -471563066,2002 -401483066,2002 -601643066,2002 -696983066,2002 1012903066,200 2 -877503066,2002	802183066,2002 406683066,2002 531603066,2002 601683066,2002 401523066,2002 306183066,2002 -9736933,7998 125663066,2002

	Lippia scorodonioides 2000	-18020000,00000	141645805,58562	,949	-681783066,2002	321383066,2002
OMC 2000	BLANCO	811920000,00000*	141645805,58562	,000	310336933,7998	1313503066,2002
	OMC20	416420000,00000	141645805,58562	,158	-85163066,2002	918003066,2002
	PAMIDATO 20	541340000,00000*	141645805,58562	,028	39756933,7998	1042923066,2002
	Lippia scorodonioides 20	611420000,00000*	141645805,58562	,010	109836933,7998	1113003066,2002
	OMC 200	411260000,00000	141645805,58562	,169	-90323066,2002	912843066,2002
	PAMIDATO 200	315920000,00000	141645805,58562	,469	-185663066,2002	817503066,2002
	Lippia scorodonioides 200	511320000,00000*	141645805,58562	,043	9736933,7998	1012903066,2002
	PAMITADO 2000	135400000,00000	141645805,58562	,992	-366183066,2002	636983066,2002
	Lippia scorodonioides 2000	331120000,00000	141645805,58562	,409	-170463066,2002	832703066,2002
PAMITADO 2000	BLANCO	676520000,00000*	141645805,58562	,004	174936933,7998	1178103066,2002
	OMC20	281020000,00000	141645805,58562	,618	-220563066,2002	782603066,2002
	PAMIDATO 20	405940000,00000	141645805,58562	,180	-95643066,2002	907523066,2002
	Lippia scorodonioides 20	476020000,00000	141645805,58562	,072	-25563066,2002	977603066,2002
	OMC 200	275860000,00000	141645805,58562	,640	-225723066,2002	777443066,2002
	PAMIDATO 200	180520000,00000	141645805,58562	,948	-321063066,2002	682103066,2002
	Lippia scorodonioides 200	375920000,00000	141645805,58562	,256	-125663066,2002	877503066,2002
	OMC 2000	-135400000,00000	141645805,58562	,992	-636983066,2002	366183066,2002
	Lippia scorodonioides 2000	195720000,00000	141645805,58562	,919	-305863066,2002	697303066,2002
	BLANCO	480800000,00000	141645805,58562	,067	-20783066,2002	982383066,2002
	OMC20	85300000,00000	141645805,58562	1,000	-416283066,2002	586883066,2002

Lippia scorodonioides 2000	PAMIDA TO 20	210220000,00000	141645805,58562	,883	-291363066,2002	711803066,2002
	Lippia scorodonioides 20	280300000,00000	141645805,58562	,621	-221283066,2002	781883066,2002
	OMC 200	80140000,00000	141645805,58562	1,000	-421443066,2002	581723066,2002
	PAMIDA TO 200	-15200000,00000	141645805,58562	1,000	-516783066,2002	486383066,2002
	Lippia scorodonioides 200	180200000,00000	141645805,58562	,949	-321383066,2002	681783066,2002
	OMC 2000	-331120000,00000	141645805,58562	,409	-832703066,2002	170463066,2002
	PAMITA DO 2000	-195720000,00000	141645805,58562	,919	-697303066,2002	305863066,2002

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ANEXOS B. Análisis estadístico de la actividad Genotóxica

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Í. MITÓTICO
N		428
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	21,2243
	Std. Deviation	5,33129
Most Extreme Differences	Absolute	,164
	Positive	,164
	Negative	-,116
Test Statistic		,164
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Í.MITÓTICO *	428	100,0%	0	0,0%	428	100,0%
TRATAMIENTO						

ANEXOS C: Evidencias fotográficas del trabajo de investigación:

Test of Homogeneity of Variances

Í.MITÓTICO

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
35,242	5	422	,000

Anexo 1-C: Control de calidad del material vegetal



Lippia scorodonioides



Secado del material vegetal



Molienda del materil vegetal



Determinación del contenido de humedad

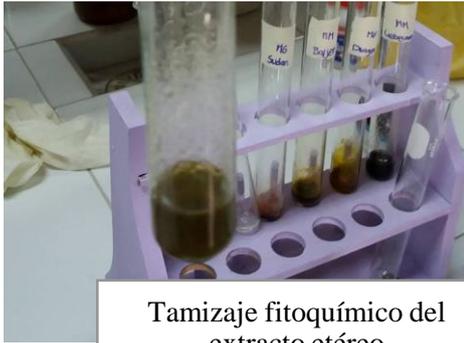


Carbonización de las muestras



Incineración de las muestras

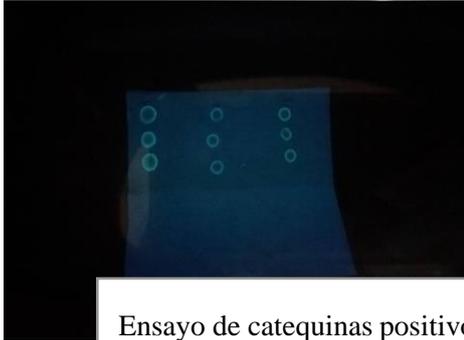
Anexo 2-C: Tamizaje fitoquímico



Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo



Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico



Ensayo de catequinas positivo



Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso

Anexo 3-B: Extracto seco de *Lippia scorodonioides*



Determinación de la densidad del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*



Determinación del índice de refracción



Concentración del extracto Hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*



Liofilización y obtención del extracto seco

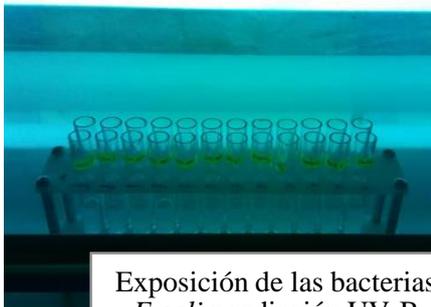
Anexo 4-C: Exposición a radiación UVB del extracto de *Lippia scorodonoides*, Pamidato y OMC



Obtención del inóculo de *Escherichia coli*



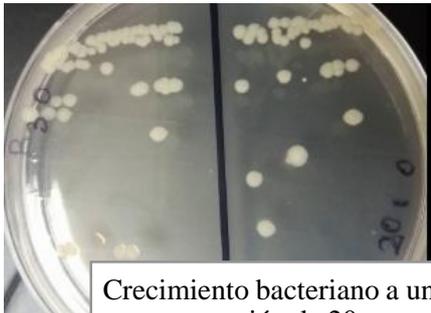
Preparación de las unidades experimentales



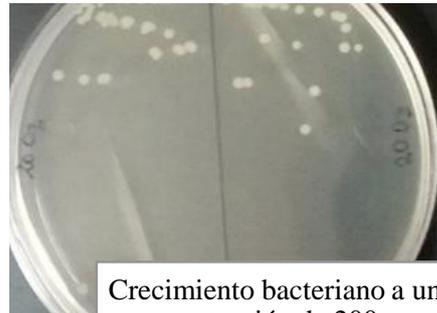
Exposición de las bacterias *E.coli* a radiación UV-B



Crecimiento bacteriano a los diferentes tiempos



Crecimiento bacteriano a una concentración de 20 ppm



Crecimiento bacteriano a una concentración de 200 ppm



Crecimiento bacteriano a una concentración de 2000 ppm

Anexo 5-C: Pruebas de Irritación ocular HET-CAM y CAM-TBS



Incubación de huevos fecundados para el ensayo



De Izquierda a derecha control negativo y control positivo HET-CAM



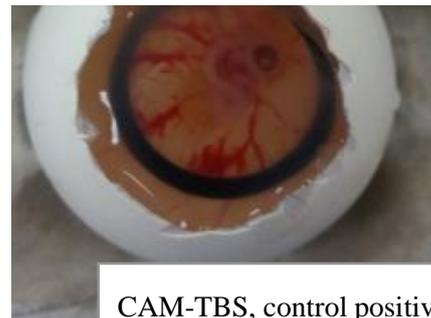
Prueba de HET-CAM con extracto de *Lippia scorodonioides*



Ensayo realizado por triplicado HET-CAM



CAM-TBS, delimitado con el anillo de goma y con el colorante



CAM-TBS, control positivo



Prueba de CAM-TBS con extracto de *Lippia scorodonioides*



Ensayo realizado por triplicado CAM-TBS

Anexo 6-C: Prueba de Genotoxicidad



Germinación de semillas de *Vicia faba*



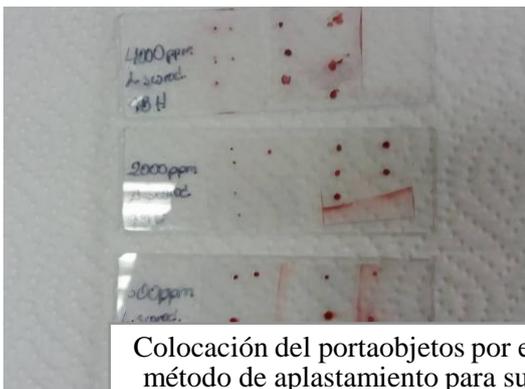
Semillas sometidas al extracto de *Lippia scorodonioides* a diferentes concentraciones



Raíces de *Vicia faba* sometida a HCl a 55°C



Tinción de los cortes transversales de raíces de *Vicia faba*



Colocación del portaobjetos por el método de aplastamiento para su observación en el microscópio



Observación de las células en diferentes fases de división celular