



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 triphylla***

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO EXPERIMENTAL

Presentado para optar el grado académico de

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MARÍA JOSE MANCHENO MONCAYO

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

Riobamba- Ecuador

2018

©2018, María José Mancheno Moncayo

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 del autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FOTOPROTECTORA, GENOTÓXICA Y DE IRRITACIÓN OCULAR *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Lippia triphylla*, de responsabilidad de la señorita María José Mancheno Moncayo, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Elizabeth Escudero, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María José Mancheno Moncayo, 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, 06 de junio de 2018

C.I: 0604242966

MARÍA JOSÉ MANCHENO MONCAYO

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, María José Mancheno Moncayo soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

MARÍA JOSÉ MANCHENO MONCAYO

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a Dios por darme la fuerza, templanza y sabiduría para poder sobrellevar los problemas y conflictos.

A mis padres Carlos Oswaldo Mancheno Donoso y Myriam del Rocío Moncayo Mayacela por ser mis pilares fundamentales durante toda mi vida, la inspiración para ser mejor y por brindarme todo su apoyo en este camino. A mi hermano Carlos Francisco, por estar pendiente, cuidarme y ser más que mi hermano mi mejor amigo.

A mi tía Ana María por ser mi segunda madre y mi fuente de consejos, a mis abuelitos que ya no están presentes, pero que siempre los llevo en mi corazón y serán para mí, mi mayor orgullo.

A todos mis amigos y seres queridos que hicieron de mi vida y formación universitaria una gran aventura.

María José Mancheno M.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios ya que es mi guía, es el que me ha enseñado que su voluntad es sagrada y que la humildad te puede llevar a cumplir tus sueños.

A mis padres por su apoyo, consejos y el gran amor, gracias a ellos he podido cumplir un sueño, el ser una profesional que a más de tener conocimientos, me he forjado de valores. A mi hermano Carlos, mi novio Adrián gracias por todo su aliento, amor y tanta fortaleza entregada.

A mis abuelitos que están en el cielo, gracias por enseñarme que el ser humano puede estar lleno de errores pero con amor y paciencia uno puede marcar la diferencia.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser la institución que me abrió las puertas para mi formación profesional.

Al grupo de investigación GIPRONAF en especial a Diego Vinueza Tapia por su ardua y valiosa contribución durante la investigación y sobre todo gracias por no dejarme sola en los momentos difíciles e indicarme que el profesor solo te guía en el campo profesional, que está en ti el ser mejor o ser mediocre.

María José Mancheno M.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I	
1 MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Radiación Solar.....	4
1.2 Radiación Ultravioleta.....	4
1.3 Tipos de Radiación UV.....	5
1.4 Índice Ultravioleta.....	6
1.5 Factores que determinan la Intensidad de la radiación UV.....	7
1.6 Efectos nocivos de la Radiación sobre la piel.....	7
1.6.1 <i>Efectos sobre la Piel</i>	8
1.6.2 <i>Efecto Ocular</i>	9
1.6.3 <i>Efectos en el Sistema Inmunológico</i>	9
1.7 Radiación Solar en el Ecuador.....	10
1.7.1 <i>Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA)</i>	10
1.8 Incidencia de Cáncer de piel en el Ecuador.....	12
1.9 Fotoprotección.....	13
1.10 Filtros y Sustancias con Acción Fotoprotectora.....	13
1.11 Flavonoides, Estructura y su efecto Fotoprotector.....	14
1.12 <i>Lippia triphylla</i>	16
1.13 Muerte Celular Inducida.....	17
1.14 <i>Escherichia coli</i> ATCC 29522.....	18
1.15 Factor de Protección Solar (FPS).....	19
1.16 Prueba de Irritación en Membrana Coriolantoidea de Huevo de Gallina (Huhner Embryonen Test (HET)).....	20
1.17 Ensayo de Micronúcleos.....	20
1.18 Análisis Estadístico.....	20

CAPÍTULO II

2	MARCO METODOLÓGICO.....	22
2.1	Lugar de Recolección de la Muestra.....	22
2.2	Lugar de Investigación.....	22
2.3	Descripción Botánica.....	22
2.4	Control de Calidad de la Droga Cruda.....	22
2.4.1	<i>Determinación del Contenido de Humedad.....</i>	22
2.4.2	<i>Determinación de Cenizas Totales.....</i>	23
2.4.3	<i>Determinación de Cenizas Solubles en Agua.....</i>	23
2.4.4	<i>Determinación de Cenizas Solubles en Ácido Clorhídrico.....</i>	24
2.5	Tamizaje Fitoquímico.....	24
2.6	Obtención y Estandarización del Extracto de <i>Lippia triphylla</i>.....	27
2.7	Cuantificación de Flavonoides Totales.....	27
2.8	Cuantificación de Fenoles Totales.....	27
2.9	Capacidad Antioxidante.....	28
2.10	Factor de Protección Solar (FPS).....	28
2.11	Estándar de Mcfarland.....	29
2.12	Efecto Fotoprotector, mediante el método observacional por radiación UVB.....	30
2.13	Prueba HET CAM, mediante el método observacional o cualitativo.....	30
2.14	Prueba CAM-TBS, mediante el método de Coloración con Azul Tripán.....	31
2.15	Ensayo de Micronúcleos.....	32

CAPÍTULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS....	34
3.1	Control de Calidad de la Droga Cruda.....	34
3.1.1	<i>Contenido de Humedad.....</i>	34
3.1.2	<i>Contenido de Cenizas Totales.....</i>	34
3.1.3	<i>Contenido de Cenizas Solubles en Agua.....</i>	35
3.1.4	<i>Contenido de Cenizas Insolubles en HCl.....</i>	35
3.2	Tamizaje Fitoquímico.....	35
3.3	Estandarización y Rendimiento de Extracción.....	38
3.4	Cuantificación de Flavonoides Totales.....	38
3.5	Cuantificación de Fenoles Totales.....	39
3.6	Capacidad Antioxidante.....	40
3.7	Efecto Fotoprotector mediante Muerte Celular Inducida por radiación UVB.....	41

3.7.1	<i>Análisis Estadístico del Efecto Fotoprotector mediante Muerte Celular Inducida por Radiación UVB</i>	45
3.8	Factor de Protección Solar (FPS)	48
3.9	Prueba HET CAM, mediante el método observacional o cualitativo	50
3.10	Prueba CAM-TBS, mediante el método de tinción con Azul Tripán	51
3.11	Ensayo de Micronúcleos	52
3.11.1	Análisis Estadístico para el ensayo de Micronúcleos	53
	CONCLUSIONES	57
	RECOMENDACIONES	58

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Clasificación Taxonómica de <i>E. coli</i>	18
Tabla 2-1.	Clasificación del FPS COLIPA.....	19
Tabla 1-2.	Ensayos Fitoquímico del extracto Alcohólico.....	26
Tabla 1-3.	Determinación del Control de Calidad de las Hojas de <i>Lippia triphylla</i>	34
Tabla 2-3.	Resultado del Tamizaje Fitoquímico de las hojas de <i>Lippia triphylla</i>	37
Tabla 4-3.	Resultado de la Estandarización y Rendimiento del extracto de <i>L. triphylla</i>	38
Tabla 5-3.	Resultado de la Cantidad de Flavonoides Totales del extracto de <i>L. triphylla</i>	39
Tabla 6-3.	Resultado de la Cantidad de Fenoles Totales del extracto de <i>L. triphylla</i>	40
Tabla 7-3.	Resultado de la Capacidad Antioxidante del Ácido Gálico.....	40
Tabla 8-3.	Resultado de la Capacidad Antioxidante del extracto de <i>Lippia triphylla</i>	41
Tabla 9-3.	Efecto Fotoprotector del etilhexil metoxicinamato (OMC).....	42
Tabla 10-3.	Efecto Fotoprotector del octildimetil-PABA.....	57
Tabla 11-3.	Efecto Fotoprotector del extracto etanólico de <i>Lippia triphylla</i>	45
Tabla 12-3.	Factores inter-sujetos.....	46
Tabla 13-3.	Test Anova de un factor para el Índice Fotoprotector.....	46
Tabla 14-3.	Prueba de Tukey para el Índice Fotoprotector.....	47
Tabla 15-3.	Prueba de Normalidad para el Índice Fotoprotector.....	47
Tabla 16-3.	Prueba de Homocedasticidad para Índice Fotoprotector.....	48
Tabla 17-3.	Resultado del FPS: OMC, PAMIDADO, <i>Lippia triphylla</i>	50
Tabla 18-3.	Resultado Prueba HET-CAM: OMC, PAMIDATO, <i>Lippia triphylla</i>	51
Tabla 19-3.	Resultado Prueba CAM-TBS: OMC, PAMIDATO, <i>Lippia triphylla</i>	52
Tabla 20-3.	Resultado Prueba Micronúcleos.....	53
Tabla 21-3.	Factores inter-sujetos para el análisis de Micronúcleos.....	54

Tabla 22-3.	Test Anova de un factor para el análisis de Micronúcleos.....	54
Tabla 23-3.	Prueba de Tukey para el análisis de Micronúcleos	55
Tabla 24-3.	Prueba de Normalidad para el análisis de Micronúcleos.....	55

ÍNDICE PARA FIGURAS

Figura 1-1.	Espectro Luminoso de la Luz Solar.....	4
Figura 2-1.	Intervalos de la Región UV en intervalos de longitud de onda.....	5
Figura 3-1.	Clasificación de la Radiación según la OMS.....	6
Figura 4-1.	Tipos de Cáncer no Melanónico.....	8
Figura 5-1.	Melanoma Maligno.....	8
Figura 6-1.	Formación de Catarata en el Cristalino.....	9
Figura 7-1.	Radiación Solar en el Ecuador.....	10
Figura 8-1.	Densidad de la Capa de Ozono a nivel Mundial.....	10
Figura 9-1.	Efecto de la Radiación UV en el Ecuador.....	11
Figura 10-1.	Índice de Radiación UV en Quito.....	11
Figura 11-1.	Porcentaje de Carcinomas en Residentes de Quito 2006-2010.....	12
Figura 12-1.	Características estructurales de los principales Flavonoides.....	15
Figura 13-1.	Flavonoides, Estructura básica y tipos.....	15
Figura 14-1.	<i>Lippia triphylla</i>	16
Figura 15-1.	Daños producidos en el ADN de la célula.....	18
Figura 16-1.	Ecuación de Mansur para determinar el FPS.....	19
Figura 1-2.	Tamizaje Fitoquímico.....	25
Figura 2-2.	Ensayos Fitoquímicos del ensayo Etéreo.....	25
Figura 3-2.	Ensayos Fitoquímicos del ensayo Alcohólico.....	26
Figura 4-2.	Valores de EE*I, establecidos.....	29
Figura 5-2.	Clasificación del FPS definido por COLIPA.....	29
Figura 6-2.	Preparación del Estándar Mcfarland.....	29
Figura 7-2.	Fórmula para determinar el Índice de Irritación.....	31
Figura 8-2.	Clasificación para determinar si el producto de Irritante.....	31
Figura 9-2.	Fórmula para determinación del potencial irritante.....	32
Figura 10-2.	Categorización del potencial Irritante prueba CAM-TBS.....	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3.	Efecto Fotoprotector contra la muerte celular inducida de bacterias E.coli por UVB. Blanco, OMC, PAMIDATO, L. triphylla 20ppm.....	43
Gráfico 2-3.	Efecto Fotoprotector contra la muerte celular inducida de bacterias E.coli por UVB. Blanco, OMC, PAMIDATO, L. triphylla 200ppm.....	43
Gráfico 3-3.	Efecto Fotoprotector contra la muerte celular inducida de bacterias E.coli por UVB. Blanco, OMC, PAMIDATO, L. triphylla 200ppm.....	44
Gráfico 4-3.	Prueba de Independencia para el Índice Fotoprotector.....	48
Gráfico 5-3.	Comparación del FPS OMC, PAMIDATO, Lippia triphylla.....	49
Gráfico 6-3.	Prueba de Independencia para el Índice de Micronúcleos.....	56

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPS	Factor de Protección Solar
OMC	etilhexil metoxicinamato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
SOLCA	Sociedad de Lucha contra el Cáncer
UFC	Unidad formadora de colonias
mg	Miligramos
h	Hora
min	Minutos
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
μL	Microlitros
ppm	Partes por millón
W/m ²	Intensidad de Radiación expresada en Vatio por metro cuadrado
CPNM	Cáncer de Piel no Melanónico
<i>L. triphylla</i>	<i>Lippia triphylla</i>

RESUMEN

En el presente trabajo de titulación tuvo como objetivo determinar la actividad fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular del extracto hidroalcohólico de *Lippia triphylla*. Se realizó el acondicionamiento y el control de calidad de la droga cruda y el tamizaje fitoquímico respectivo, en donde se demostró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. Mediante métodos espectrofotométricos se pudo determinar con la ecuación de Mansur el Factor de protección Solar con un resultado de 2 para el extracto de *Lippia triphylla*, un FPS de 13 para etilhexil metoxicinamato (OMC) y un FPS de 18 para octildimetil-PABA, a una concentración de 20 ppm. La actividad fotoprotectora evaluada *in vitro* a través del método de muerte celular inducida sobre bacterias *E. coli* ATCC 25922 demostró que a concentraciones elevadas el factor de protección ante radiación UVB aumenta debido a la mayor supervivencia de las colonias bacterianas; con respecto a la concentración de 2000 ppm del extracto de *Lippia triphylla* este mostró una elevada protección hasta los 90 minutos, para los estándares OMC y PABA las UFC supervivientes fueron hasta los 120 minutos. En relación a la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en el extracto, los resultados fueron de 4,864 mg Equivalentes de Quercetina/g de liofilizado para flavonoides totales y un 16,48 mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de liofilizado para fenoles totales. La capacidad de captación de radicales libres obtuvo un IC₅₀ de 709,66 (µg mL⁻¹), se realizaron los estudios toxicológicos en función de la irritabilidad ocular y genotoxicidad respectivamente, con ensayos alternativos al test de Draize como lo son HET-CAM y CAM-TBS con un resultado de No Irritantes para ambos casos. Finalmente, para determinar el grado de genotoxicidad se usaron las raíces de *Vicia faba* en donde los diferentes extractos de *Lippia triphylla* no causaron alteraciones en la división celular ni la formación de micronúcleos, es decir no afectaron al ADN ni a proteínas reguladores de la mitosis.

Palabras clave: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <EXTRACTO LIOFILIZADO>, <RADIACIÓN UV>, <FOTOPROTECCIÓN>, <CEDRÓN (*Lippia triphylla*)>, <*Escherichia coli*>, <MICRONÚCLEOS>, <IRRITACIÓN OCULAR>, <GENOTOXICIDAD>

ABSTRACT

The purpose of the present research work was to determine the photoprotective, genotoxic and ocular irritation activity of *Lippia triphylla*. hydroalcoholic extract. The conditioning and quality control of the crude drug and the respective phytochemical screening were carried out, where the presence of phenolic compounds and flavonoids was demonstrated. Using spectrophotometric methods, the Sun Protection Factor could be determined with a result of 2 for *Lippia triphylla* extract, a SPF of 13 for ethylhexyl methoxycinnamate (OMC) and a SPF of 18 for octyldimethyl-PABA. 20 ppm concentration. The photoprotective activity evaluated *in vitro* through the method of cell death induced on bacteria *E. coli* ATCC 25922 showed that at high concentrations the protection factor with respect to UVB radiation increases due to the longer survival of the bacterial colonies; with respect to the concentration of 2000 ppm of the extract of *Lippia triphylla* it showed a high protection to 90 minutes, for the OMC and PABA standards the surviving UFC were up to 120 minutes. In relation to the amount of phenols and flavonoids present in the extract, the results were 4.864 mg Equivalents to Quercetin/g lyophilized for total flavonoids and 16.48 mg Equivalents to Gallic Acid/g lyophilized for total phenols. The free radical uptake capacity obtained an LC₅₀ of 709.66 (µg mL⁻¹). Toxicological studies were performed based on ocular irritability and genotoxicity respectively, with alternative tests to Draize test such as HET-CAM and CAM -TBS with a result of No Irritants for both cases. Finally, to determine the degree of genotoxicity, the roots of *Vicia faba* were used, where the different extracts of *Lippia triphylla* did not cause alterations in the cell division or the formation of micronuclei, it means, they did not affect the DNA or proteins that regulate mitosis.

Keywords <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACOLOGY>, <LIOFILIZED EXTRACT>, <UV RADIATION>, <PHOTOPROTECTION>, <CEDRON (*Lippia triphylla*)>, <*Escherichia coli*>, <MICRONUCLEUS>, <IRRITATION EYE>, <GENOTOXICITY>.

INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta es la causa ambiental de mayor importancia que altera la homeostasis de la piel como órgano, afectando la supervivencia, proliferación y diferenciación de varios tipos celulares. La forma sobresaliente de radiación ultravioleta que llega a la superficie terrestre es la forma de ultravioleta A (UVA) y en menor proporción se encuentra una forma denominada ultravioleta B (UVB) (Duro, 2003, pp. 27-32). La destrucción diaria de la capa de ozono tiene un gran impacto en la cantidad de UVB que llega a la superficie terrestre, lo cual establece un tema de preocupación mundial por el incremento del riesgo de aparición de fenómenos como la mutagénesis y fotocarcinogénesis (Young, Claveau, & Rossi, 2017, pp. 12-16).

El efecto de la radiación es responsable de una amplia variedad de afectaciones agudas y crónicas en la piel. En general, los efectos que genera la exposición solar son perjudiciales con la excepción de la estimulación de la síntesis de vitamina D, necesaria para el normal crecimiento y desarrollo esquelético (Logroño, 2018, pp. 2-12). Los efectos agudos de la radiación ultravioleta en la piel encierran: daño al DNA, apoptosis, eritema, inmunosupresión y aumento de la pigmentación por estimulación de la melanogénesis. Los efectos a largo plazo de la radiación ultravioleta en la piel incluyen fotoenvejecimiento y cáncer (SOLCA-Guayaquil, 2014, pp. 67-70).

La Organización Mundial de la Salud y la Organización Meteorológica Mundial revela que un valor de radiación en términos de índice ultravioleta (IUV) mayor a 5, indica exposición a radiación UVA por parte de población, además la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana indicó que la radiación frecuente en el Ecuador es de 24 IUV para las ciudades de Quito y Guayaquil, indicando el potencial riesgo al que la población ecuatoriana está sometida diariamente (Rojas, 2012, pp. 45-67).

La protección solar es un método efectivo para prevenir los efectos dañinos de la radiación ultravioleta. El uso de fotoprotector es un componente importante y de primera línea de las estrategias de protección solar, que también deberían incluir el uso de ropa con tejido compacto, sombreros, buscar la sombra y evitar la exposición solar en las horas pico. Se ha probado que los fotoprotectores tienen efectos positivos en la disminución de los signos de envejecimiento y en la incidencia de los cánceres de piel (SOLCA-Guayaquil, 2014, pp. 23-27).

Una vez analizados los problemas que son generados por la radiación sobre la piel, se observa que se necesitan de manera urgente protectores solares que ayuden a reducir la tasa de mortalidad por cáncer de piel, especialmente en nuestro país que es de un 65 % para melanomas malignos (Xiao et al., 2016). Es por ello que esta investigación permite evaluar de manera *in vitro* extractos de plantas que pueden con concentraciones mínimas producir barreras contra la radiación UV más eficaces, seguros y duraderos con refuerzo de su análisis genotóxico y de irritación ocular. Estos

estudios adicionales, son de vital importancia dentro del campo de evaluación de toxicidad de un extracto, ya que existen compuestos químicos que las plantas usan como defensa ante el medio en donde se desarrollan, por lo que pueden ser útiles para el desarrollo de fotoprotectores.

La familia *Aloysia* está compuesta por metabolitos como flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos, entre otros, los cuales se extraerán para su estudio en fotoprotección. Estos compuestos, en especial los flavonoides son los responsables de proteger a la planta ante los rayos solares, por lo que, al encontrarse la planta en estudio a mayor altura, podría ser sugerido que la eficiencia en protección sea mayor (Maske, Lokapure, Nimbalkar, Malavi, & John, 2013, pp. 35-68).

Además de la fase de protección solar, se evalúan problemas de toxicidad mediante análisis de genotoxicidad, el cual analiza la existencia de daños en el ADN los cuales no necesariamente pueden ser peligrosos para la salud. Por otro lado la evaluación del efecto de irritación ocular es realizado en huevos de 10 días de fecundación, en donde se determina el rango tóxico del extracto, así como el daño producido en las células mediante la coloración con Azul Tripán.

Por todo lo mencionado, se ha visto pertinente la necesidad de investigar principios activos naturales, en donde su extracto permita evaluar la eficiencia de fotoprotección en especial *de Lippia triphylla*, ya que es un arbusto que se encuentra ubicado a 2500 y 3000 metros de altura.

OBJETIVOS

- **GENERAL**

Determinar del efecto fotoprotector y la seguridad de uso potencial del extracto hidroalcohólico de *Lippia triphylla*.

- **ESPECÍFICOS**

Determinar el efecto fotoprotector de los extractos de *Lippia triphylla*, 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 triphylla* por espectrometría mediante la ecuación de Mansur.

Determinar el potencial irritativo ocular del extracto de *Lippia triphylla* a través de la prueba alternativa sobre membrana coriolantoidea.

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

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Radiación Solar

La radiación solar es energía electromagnética emitida, que está compuesta por el espectro de luz UV (ultravioleta) 100 a 400 nm, la Luz Visible con longitud de onda de 400 a 760 nm e Infrarroja (760 a 1800nm) (Socorro, Fernando, & Humberto, 2012, pp. 13-16). Del total de energía que alcanza la Tierra las radiaciones emitidas son transformadas o retenidas por diversos factores antes de ingresar al Tierra como lo es la Capa de Ozono factor principal que capta la mayoría de los rayos UVB Y UVC (Jovic, Anicic, Marsenic, & Nedic, 2016, pp. 25-34).

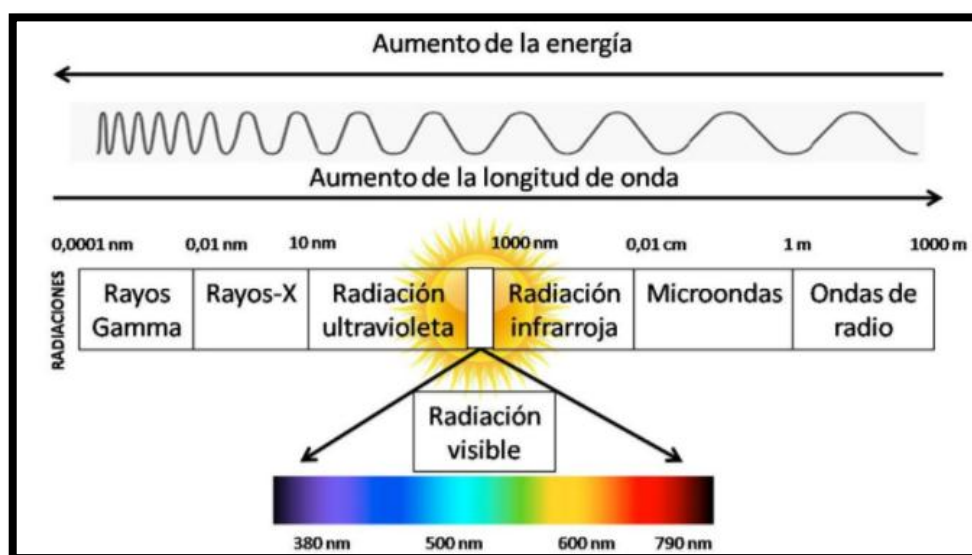


Figura 1-1. Espectro luminoso de la Luz Solar

Fuente: (Socorro et al., 2012, pp. 54-67)

1.2 Radiación ultravioleta

La radiación Ultravioleta o UV es una de las energías del sol la cual se transmite en forma de ondas electromagnéticas y una longitud de onda floclante entre 100 y 400 nm, además constituye la Proción más energética del espectro electromagnético que incide sobre la Tierra (Ángel, Camones, Eva, Chota, & Malla, 2014, pp. 1-17).

La radiación desprendida representa un papel fundamental para las condiciones climáticas, el balance de la energía y el equilibrio normal de la planta. Cantidades pequeñas de UV son importantes y necesarias para que los seres humanos transformen esta energía, la absorban y

asimilen la vitamina D, en el reino vegetal ayuda al proceso de la fotosíntesis en condiciones de radiación no peligrosas para afectar las funciones normales de las plantas (Zamorano-ponce, Fernández, Vargas, Rivera, & Carballo, 2004, pp. 98-102).

Cuando la piel es alcanzada por la radiación UV, una parte es reflejada y otra es transmitida a diferentes capas celulares, hasta que el rayo se esparce; la porción absorbida incide sobre tejidos genera daños tisulares. La afectación producida por la irradiación UV, depende de la intensidad de la radiación, el tiempo de exposición y tipo o fototipo de cada persona (Y Gilaberte & Gonza, 2010, pp. 17-19).

La exposición prolongada a la radiación UV puede generar efectos agudos como crónicos en la salud de la piel, sistema ocular e inmunitario. Las quemaduras o el bronceado son los efectos agudos conocidos, lo cual con el paso del tiempo puede producir envejecimiento como consecuencia de la muerte de las células; los efectos crónicos conllevan a la aparición de cáncer y cataratas (Iida, Yamasaki, Masuoka, & Á, 2008, pp. 3-9).

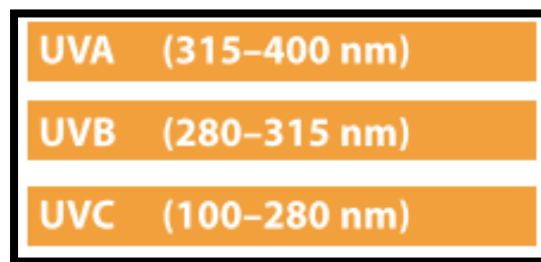


Figura 2-1. Intervalos de la región UV en intervalos de longitud de onda.
Fuente: (Iida et al., 2008, pp. 34-47)

1.3 Tipos de radiación UV

Se clasifica en tres tipos en función de su longitud de onda. Cuanto mayor sea ésta, menos energía tendrá, y viceversa.

RAYOS UVC: con una longitud de onda entre 100 y 290 nm, son rayos sumamente agresivos, pero solo llegan a las primeras capas de la atmósfera debido a que son absorbidos y retenidos, por lo que no son una causa normal de cáncer de piel (Sru, Gho, Devruelgr, Gh, & Ghwhfwdeoh, 2013, pp. 12-19).

RAYOS UVB: longitud de onda entre 290 a 320 nm, este tipo de radiación atraviesa las primeras capas de la capa atmosférica y son absorbidos por la capa de ozono u las nubes. Los rayos UVB puede producir daños en el ADN, quemaduras o ampollas en la piel, considerándose los más peligrosos para el organismo por su efecto en la formación de cáncer (Sru et al., 2013, pp. 39-41).

RAYOS UVA: (320 a 400 nm) esta radiación traspasa las capas atmosféricas por lo que tienen la capacidad de incidir sobre las capas más profundas de la piel activando la producción de la melanina y estimulando el bronceado. Además tiene la característica de destruir la elasticidad propia de la piel, provocando envejecimiento, manchas y lesiones precancerosas y cancerosas (Sru et al., 2013, pp. 79-81).

1.4 Índice Ultravioleta

Se define como la medida en forma cualitativa y cuantitativa de la intensidad de la radiación UV emitida por el sol que llega al planeta Tierra y causa efectos sobre la piel del ser humano (Alborghetti et al., 2015, pp. 65-74).

Se clasifica según su intensidad en:

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

Tabla 1: Categorías de exposición a la radiación UV



Figura 3-1. Clasificación de la Intensidad de Radiación según la OMS

Fuente: (Alborghetti et al., 2015, pp. 19-25)

El daño que puede producir la radiación según su intensidad puede variar según el Fototipo de piel de cada individuo, debido a la cantidad de melanina producida y otros agentes protectores (Batlle, 2005, pp. 54-57).

Dentro de los fototipos existentes se encuentran:

Fototipo I y II carecen o tienen una deficiencia de melanina en su composición por lo que habitualmente sufre quemaduras dejando al piel roja.

Fototipo III – IV- V- VI: contiene melanina suficiente para generar protección ante índices de radiación 1 y 2, normalmente este tipo de personas sufren bronceados. Existe un serio problema con los fototipos V y VI ya que cuando sufren alteraciones mutagénicas el cáncer se diagnostica en periodos tardíos por lo que causa la mayoría de muertes (Batlle, 2005, pp. 28-43).

1.5 Factores que determinan la Intensidad de la Radiación UV

Altura del Sol: mientras más elevado este el sol en el cielo más intensa será la radiación generalmente durante el verano y mediodía.

Latitud: cuanto más cerca de la línea ecuatorial menor distancia recorrerá el rayo solar hacia la Tierra.

Nubosidad: la intensidad de radiación es elevada cuando el cielo es despejado pero eso no indica que no existen posibles daños en la piel debido a que las nubes no absorben los rayos UV.

Altitud: a mayor altitud, más cerca del sol se encuentra y por ende más daño solar.

Ozono: la capa de ozono absorbe los rayos UV que más daño causan a la piel (UVB-UVC) pero por el daño sufrido los rayos UVA pasan en mayor proporción con un 5% de los rayos UVB (Berengust, 2013, pp. 12-24).

1.6 Efectos nocivos de la Radiación sobre la Piel

El 5% de la radiación que llega a epidermis es reflejada por cromóforos como ADN, ARN, Ácido urocánico, tirosina, triptófano, melanina (Gilaberte & Gonza, 2010, pp. 98-117). El resto ingresa a la dermis provocando daños especialmente en el ADN de la piel en donde se forman dímeros de pirimidina lo que dan lugar a lesiones que producen a la larga mutación y cáncer en la piel (Berengust, 2013, pp. 34-41).

1.6.1 Efecto sobre la Piel: el efecto agudo principal generado ante la radiación elevada es el enrojecimiento que en luego en diversos fototipos produce el bronceado debido al aumento de

melanina como agente protector, otro efecto cuando el dalo es más profundo es la lesión de células, tejido fibroso o vasos sanguíneos originando procesos degenerativos, pecas, paño o pérdida de la elasticidad y arrugas (Mej & Mej, 2014, pp. 89-115).

a) **Cáncer no Melanónico:** este tipo de cáncer se clasifica en carcinoma de tipo basal o carcinoma de tipo escamosos, estas alteraciones de la piel rara vez son mortales pero su tratamiento es muy doloroso y desfigurante. Los CPNM son más frecuentes en zonas como orejas, cuello, brazos y cara debido a que no existe la adecuada protección por parte de las personas.

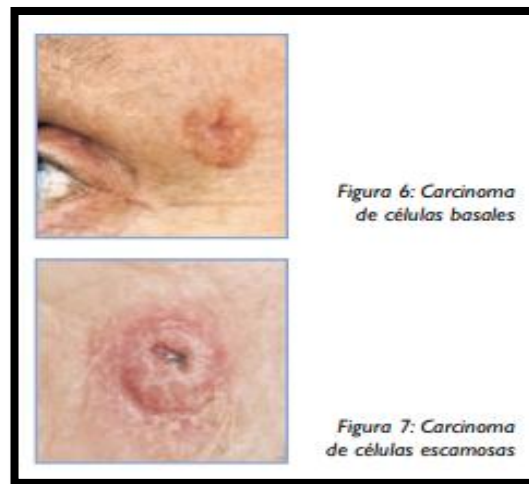


Figura 4-1.Tipos de Cáncer no Melanónico
Fuente: (Organización Mundial de la Salud, 2003, pp. 23-29)

b) **Melanoma Maligno:** este tipo de cáncer es más detectable que el CPNM, es mucho menos frecuente pero tiene una alta tasa de mortalidad en relación al cáncer de piel. Hay que tener en cuenta que debido a la destrucción de la capa de ozono su aparición en la sociedad puede aumentar ya que la gente desconoce de cómo proteger la zonas del cuerpo.

El principal factor de aparición del Melanoma Maligno es el Fototipo de piel I y II, es decir la gente con piel clara, produciendo la aparición de lunares atípicos. Además afectaciones en la piel como el enrojecimiento tarda mucho más tiempo en desaparecer lo que aumenta el riesgo de sufrir cáncer (Mej & Mej, 2014, pp. 13-17).

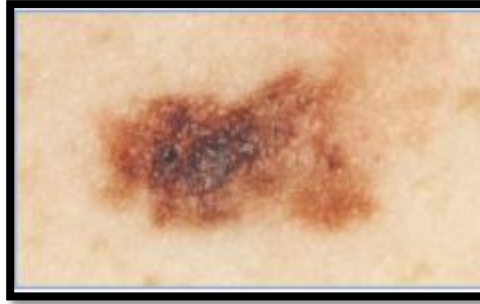


Figura 5-1. Melanoma Maligno
Fuente: (Organización Mundial de la Salud, 2003, pp. 87-91)

1.6.2 Efecto Ocular:

Los ojos están ubicados en cavidades protegidos por las cejas, arco superciliar y las pestañas pero en condiciones extremas el reflejo de la radiación puede producir enfermedades como fotoqueratitis (enfermedad del soldador), conjuntivitis los cuales con efectos inflamatorios del globo ocular causando enrojecimiento fotosensibilidad y lagrimeo constante (Rivera, 2017, pp. 61-78).

La principal causa de ceguera en las personas son las cataratas causada principalmente por efectos genéticos o desnaturalización de las proteínas del cristalino causadas por altas radiaciones o reflejos generados por el sol (Rodríguez-angeles & C, 2002, pp. 14-39).

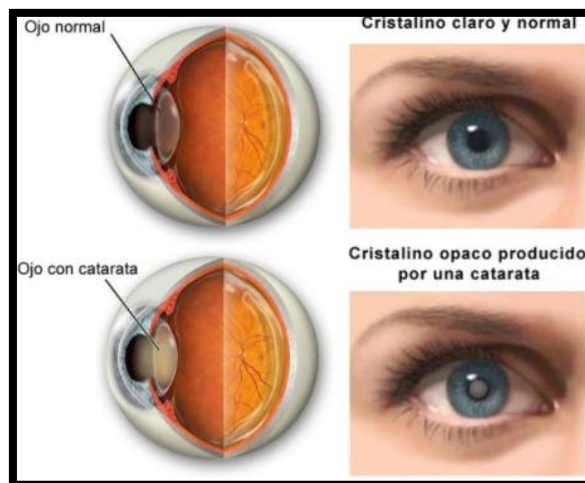


Figura 6-1. Formación de catarata en el cristalino.
Fuente: (Rodríguez-angeles & C, 2002, pp. 54-63)

1.6.3 Efecto en el Sistema Inmunológico:

El efecto principal es la modificación de las defensas propias de del organismo humano, produciendo una disminución de células protectoras e inmunitarias. Además en países con altos

índices UV se produce la disminución de la eficacia de las vacunas lo que genera un impacto dentro de la salud pública (Farmacéuticos., 2014, pp. 27-56).

1.7 Radiación Solar en el Ecuador

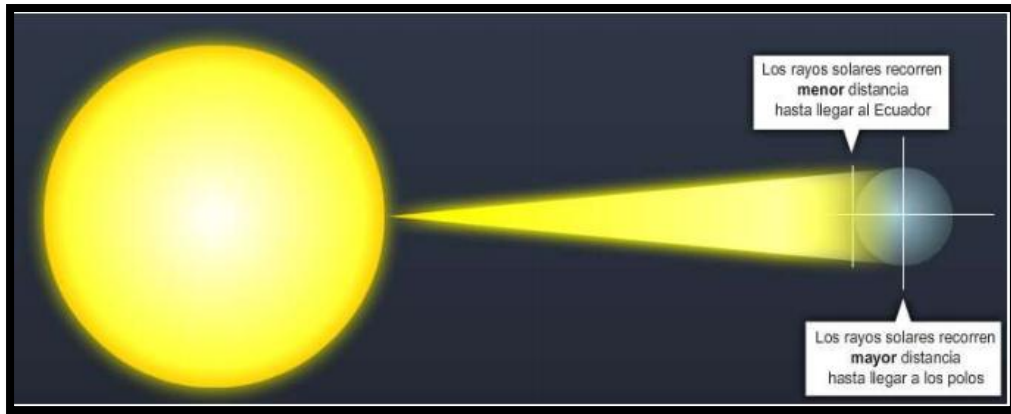


Figura 7-1. Radiación Solar en el Ecuador.
Fuente: (Rodríguez-angeles & C, 2002, pp. 31-42)

El Ecuador sufre un aumento diario de la radiación solar en diversas ciudades, esto es debido principalmente a su ubicación geográfica (ubicado en la línea ecuatorial) ya que la radiación recorre una menor distancia hasta llegar a la Tierra (Nacional, San, & Bioquímica, 2015, pp. 54-61).

1.7.1 Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA): es una organización no política del Ecuador, ubicada en Guayaquil desde el año 2007, su objetivo principal es definir el daño en a capa de ozono y determinar los índices de radiación en las diversas ciudades del país mediante el Proyecto Hiperión (Ma et al., 1995, pp. 76-82).

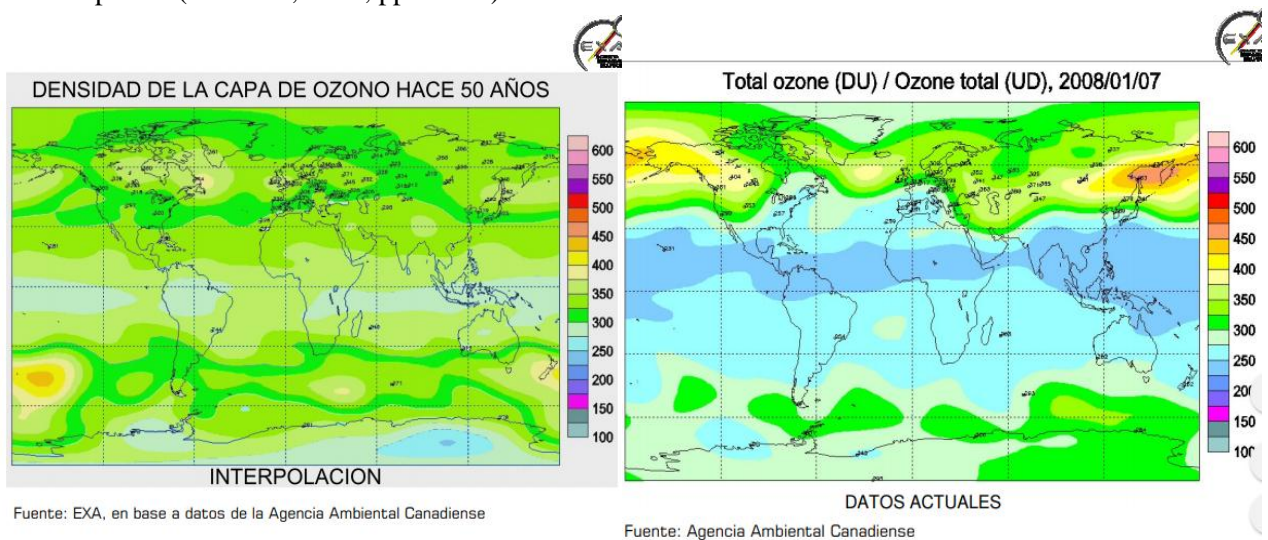


Figura 8-1. Densidad de la Capa de Ozono a nivel Mundial.
Fuente: (Ma et al., 1995, pp. 21-16)

Según su informe en el 2008, indican que ciudades como Quito (IUV=24), Guayaquil (IUV=14) tienen los índices más elevados a nivel mundial, es por ello que niños y adultos poseen su cara roja y piel más gruesa. Actualmente ciudades como Riobamba, Latacunga, Loja entre otras llegan a niveles de radiación hasta de 20 (Duro, 2003, pp 14-19).

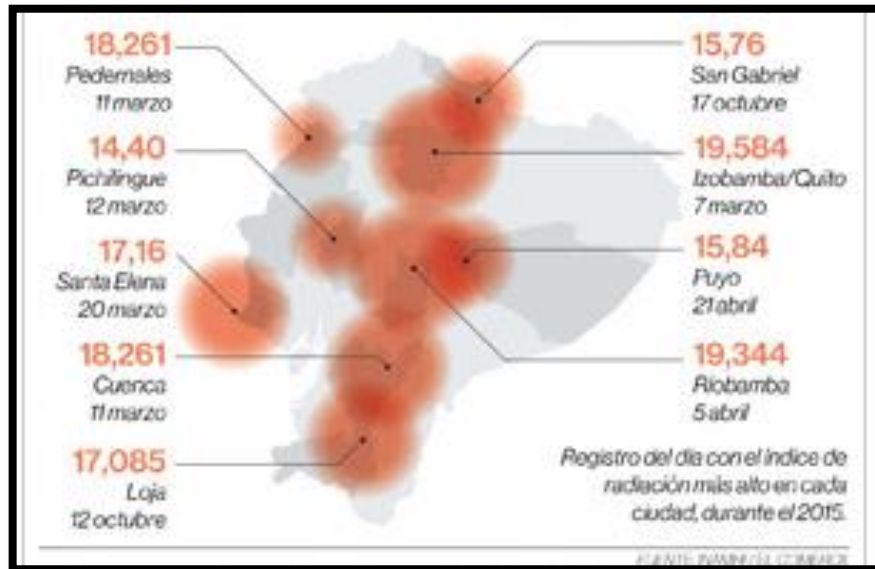


Figura 9-1. Efecto de la Radiación UV en el Ecuador.
Fuente: (Qu & Km, 2016, pp. 43-51)

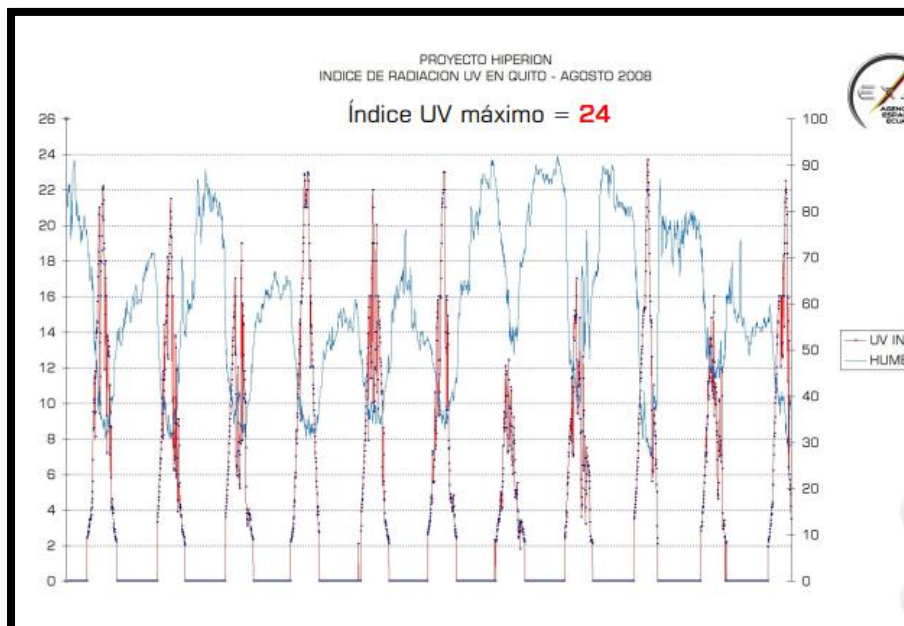


Figura 10-1. Índice de Radiación UV en Quito.
Fuente: (Lopez, 2014, pp. 41-67)

1.8 Incidencia de Cáncer de piel en el Ecuador.

La incidencia de cáncer de piel ha aumentado notoriamente en todo el mundo, según cifras de la OMS, se calcula que cada año se producen a escala global dos millones de nuevos casos de cáncer de piel. Y en el Ecuador, esas cifras no son aisladas, el Epidemiólogo del Registro Nacional de Tumores de SOLCA (núcleo Quito), aseguro que el cáncer de piel tiene una tendencia creciente, las razones de este crecimiento indica que se debe a la pérdida de respeto a la radiación solar (SOLCA-Guayaquil, 2014, pp. 31-45). En décadas pasadas las personas se protegían del sol con sombreros de ala ancha, prendas gruesas y las personas se resguardaban del sol cuando iban a la playa.

Según datos levantados por SOLCA, las ciudades con mayor incidencia de esta enfermedad están en la Sierra, esto se debe que al estar en mayor altitud sobre el nivel del mar, la exposición a las radiaciones solares también aumenta. A pesar de que este tipo de cáncer se presenta en edad avanzada, en los últimos años hay casos que por factores congénitos aparece en edad temprana. La exposición dañina al sol se inicia en la infancia. Como la piel tiene memoria y luego de varios años de estar expuestos a la radiación aparecen los tumores cancerígeno (SOLCA-Guayaquil, 2014, pp. 45-61).

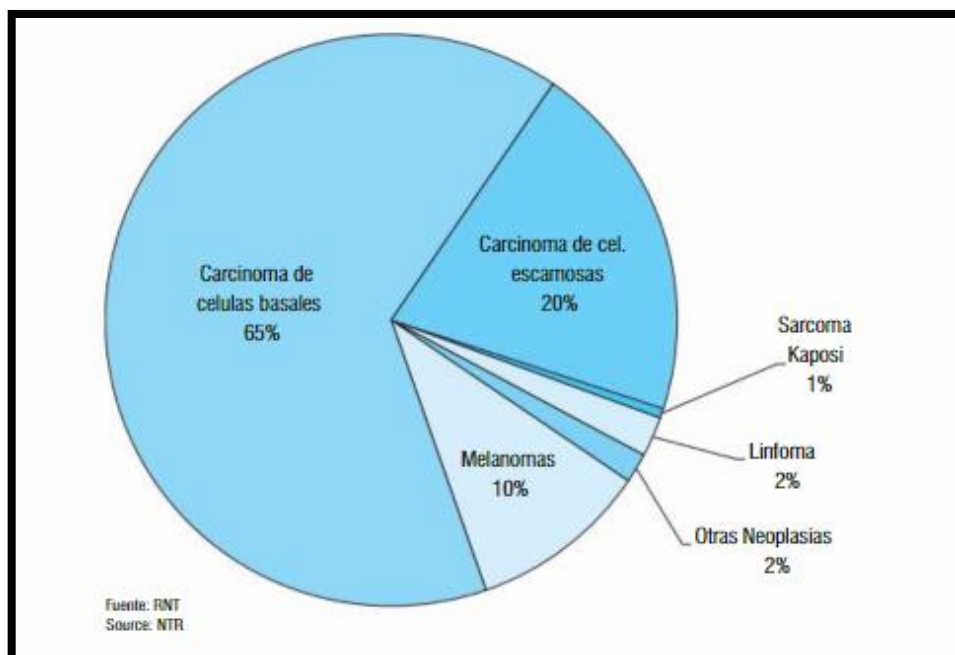


Figura 11-1. Porcentaje de Carcinomas en Residentes de Quito 2006-2010.

Fuente: (SOLCA-Guayaquil, 2014, pp. 45-61)

1.9 Fotoprotección

Los fotoprotectores contienen diversas sustancias que ayudan a adsorber, reflejar o dispersar la radiación UV, con el fin de evitar la penetración cutánea impidiendo el daño actínico eritemas y quemaduras solares frente a la radiación UVB y UVA. Es por ello que un fotoprotector es aquel que pueda prevenir, mejorar y reparar daños ocasionados por el sol (Costa, Villegas, Donoso, & Correa, 2007, pp. 19-37).

La protección de la piel ante el sol se desarrolla a base del cumplimiento de diversos requisitos biofísicos (Iida et al., 2008, pp. 13-17):

- Absorción y filtración de la radiación UV en la superficie del estrato córneo a fin de prevenir su penetración hacia la epidermis y la dermis.
- Dispersión de las radiaciones.
- Reflexión de las mismas mediante la aplicación de sustancias «barrera».
- Inactivación o destrucción de los radicales libres y las ROS que se producen en la piel foto expuesta
- Reparación del daño celular inducido por radiación solar.

1.10 Filtros y sustancias con Acción Fotoprotectora

En calidad del mecanismo de acción se clasifican en tres grupos:

a) Filtros Físicos:

Su mecanismo de acción es actuar como una pantalla solar, reduciendo y eliminando los efectos de los rayos solares sobre la piel. Generalmente son pigmentos micronizados (10-50 nm) minerales como Dióxido de Titanio, Óxido de Zinc, Carbonato de Calcio, Cloruro de Hierro (Paper, 2015, pp. 62-73).

b) Filtros Químicos:

Son sustancias orgánicas aromáticas que absorben la radiación UV en donde la energía asimilada se emite como radiación térmica. Se clasifican en función del tipo de radiación que absorbe UVA (Benzofenonas, Dibenzoilmetanos, etc.) o UVB como: PABA (ácido p-aminobenzóico), Salicilatos, Ácido Cinámico (Luepke, 1985, pp. 34-45).

c) **Otras Sustancias Protectoras:**

Además de los filtros químicos y físicos, existen diversos principios activos con actividad antioxidante, secuestradora y reparadora. Asimismo pueden actuar como coadyuvantes dentro de la protección solar, dentro de este grupo encontramos las Vitaminas A (beta carotenos), B (pantenol), E (alfa tocoferol), lo cuales se encuentran principalmente en frutas y verduras (Zamorano-ponce et al., 2004, pp. 18-19).

1.11 Flavonoides, Estructura y su efecto Fotoprotector

Los flavonoides son compuestos pigmentantes de las plantas que generan protección frente al daño oxidativo producido por radiaciones como la UV, sustancias químicas, etc. Estos metabolitos secundarios tienen en su estructura química grupos hidroxilo fenólicos y grandes propiedades quelantes (en especial del hierro). Además poseen efectos terapéuticos como tratamiento de cardiopatías, aterosclerosis y el cáncer. Las radiaciones UV que son generadas por el sol produce en las células el proceso denominado Estrés Oxidativo por la formación de las denominadas EROs (Especies Reactivas de Oxígeno), este proceso generara posibles daños en el ADN mediante la producción de dímeros de pirimidina lo que a futuro desarrolla mutagénesis o cáncer de piel (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013, pp. 26-41).

Dentro de la estructura de los flavonoides encontramos su bajo peso molecular; están formados por un esqueleto difenil pirano, es decir dos anillos fenilos (A y B) ligados por un anillo C pirano. La actividad antioxidante depende de las propiedades redox de los grupos hidroxifenólicos, los flavonoides orto-di hidrosustituídos como la quercetina son mejores captadores y protectores UV comparados con los mono hidrosustituídos (Raffa, Maggio, Raimondi, Plescia, & Daidone, 2017, pp. 76-82).

Existen tres características fundamentales que califican el tipo de fotoprotección que generarán los flavonoides al interactuar frente a la radiación UV, estos son:

- Anillo B de la estructura orto-dihidroxi.
- Doble enlace en la posición 2,3.

- Existencia de grupos hidroxilo en la posición 3 y 5.

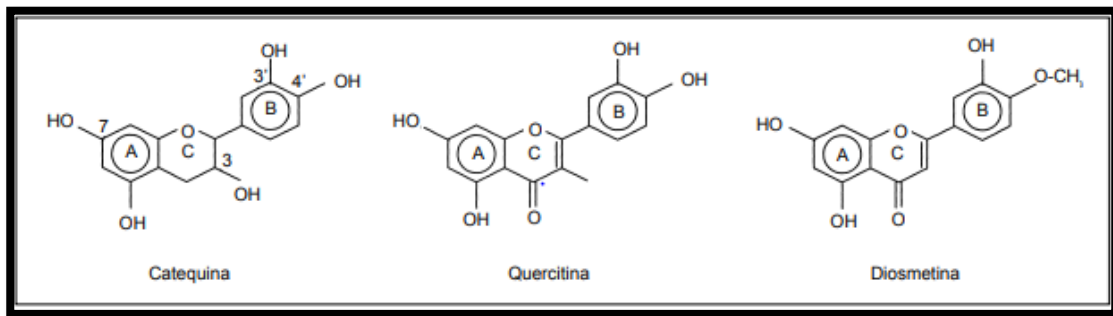


Figura 12-1. Características estructurales de los principales Flavonoides.

Fuente: (Raffa et al., 2017, pp. 36-61)

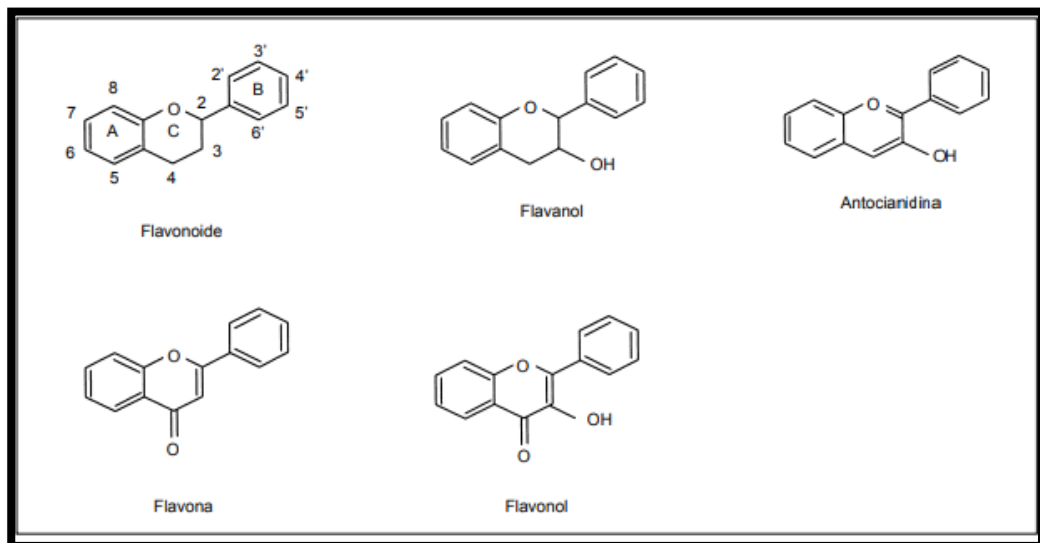


Figura 13-1. Flavonoides, Estructura básica y tipos.

Fuente: (Raffa et al., 2017, pp. 71-81)

Estudios realizados han demostrado que diversos flavonoides poseen actividades fotoprotectoras:

- Silimarina: caracterizada por contener tres flavonoides: silibinina, silidiannina y silicristina, su aplicación evita la formación de dímeros de pirimidina tras la absorción de los rayos UVB reduciendo hasta un 92 % la aparición de tumores (Quirantes-Piné et al., 2013, pp. 53-61).
- Genisteína (Isoflavona de la soja): actúa ante el daño oxidativo, la apoptosis y la inmunosupresión generada por la exposición a la radiación UV (Zamorano-ponce et al., 2004, pp. 57-59).
- Isoflavonoides del trébol rojo: actúa frente a la inmunosupresión, principalmente el equol (Raffa et al., 2017, pp. 1-6).
- Quercetina: contiene actividades anti UV potentes inhibiendo en mayor proporción las radiaciones UVB (Zamorano-ponce et al., 2004, pp. 36-39).

1.12 *Lippia triphylla*



Figura 14-1. *Lippia triphylla*.

Fuente:(Radice et al., 2016, pp. 61-79)

Taxonomía:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Aloysia*

Especie: *Aloysia triphylla*, (Cestari & Buster, 2017, pp. 85-92)

Nombres vulgares:

Colombia, Ecuador, México=Cidrón- Cedrón, Europa=Verbena de las Indias, Sudáfrica= Lemon

Verbena, España= Hierba Luisa (Quirantes-Piné et al., 2013, pp. 76-84)

Nombre científico:

Aloysia triphylla L'Herit =*Verbena triphylla*= *Lippia triphylla*

Origen:

Planta originaria de Sudamérica especialmente Argentina, Ecuador, Chile, Perú, cultivada en Europa, África debido a sus actividades curativas: antiespasmódicas, antioxidantes, tranquilizantes (Cestari & Buster, 2017, pp. 63-74).

En el Ecuador se encuentra cultivada en provincias como Azuay, Bolívar, Loja, Pichincha, Tungurahua y Chimborazo (Adejumo, Suleiman, & Okagbue, 2017, pp. 17-23).

Descripción:

El cedrón es un arbusto de aproximadamente 1,50 y 3 metro de altura, posee tallos leñosos, angulosos o redondos ramificados. Sus hojas verticiladas de hasta 6-7 cm son simples formando un conjunto de tres y rara vez cuatro, de margen liso y color verde. Sus flores son pequeñas generalmente blanquecinas-violáceas agrupadas (Allorent & Petroutsos, 2017, pp. 75-85).

Elevación: 2500 – 3000, 3000-3500 metros de altura (Adejumo et al., 2017, pp. 17-21).

Composición química

Lippia triphylla fue introducida o cultivada en diferentes continentes como Asia y Europa debido a sus beneficios curativos, generando efectos antiespasmódicos, antitumorales, tranquilizantes o sedantes, antioxidantes y digestivas. Principalmente sus hojas contienen metabolitos secundarios como flavonoides, glucósidos, fenilpropanoides, ácidos fenólicos, aceites esenciales como sesqui terpenos entre los más abundantes (Allorent & Petroutsos, 2017, pp. 15-18).

Los efectos antitumorales, fotoprotectores y antimicrobianos se han atribuido a su gran actividad antioxidante, sus compuestos fenólicos (catalasa, peroxidasa, glutatión), limitan el daño oxidativo causado por Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) evitando la aparición de enfermedades como arteriosclerosis, cáncer, inflamatorias entre otras (Adejumo, Suleiman, & Okagbue, 2017, pp. 32-45).

1.13 Muerte Celular Inducida

Las diversas radiaciones UV, generan variaciones en diversas partes de la célula, dependiendo el tiempo, cantidad y exposición absorbida, produciendo daños en el material genético y lisis celular (Jovic, Anicic, Marsenic, & Nedic, 2016, pp. 26-39).

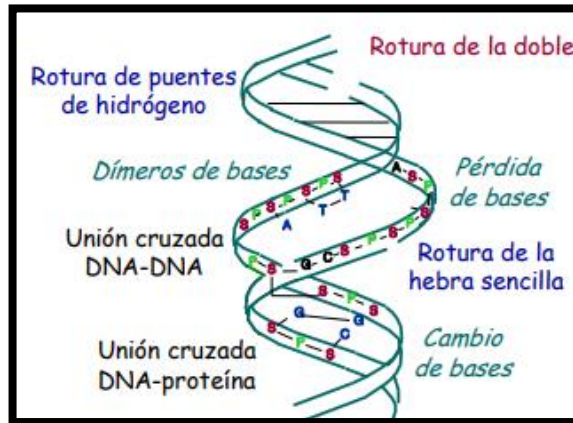


Figura 15-1. Daños producidos en el ADN de la Célula.
Fuente: (Quirantes-Piné et al., 2013, pp. 37-41)

1.14 *Escherichia coli* ATCC (29522)

La denominación ATCC (American Type Culture Collection), deriva de una organización privada de recurso biológicos cuyo objetivo principal es la producción, conservación y distribución de diferentes microorganismos con referencia estándar para las diversas investigaciones a nivel mundial (Radice et al., 2016, pp. 17-61).

Taxonomía

Tabla 1-1. Clasificación Taxonómica de *E.coli*

Reino	Bacteria
Clase	Grammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Escherichia
Especie	<i>Escherichia coli</i>

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Fuente: (Radice et al., 2016, pp. 31-48)

E. coli es un bacilo anaerobio facultativo Gram negativo, con un tamaño entre 0,5 micras de ancho por 3 micras de largo, de la familia Enterobacteriaceae, esta bacteria coloniza de manera natural el intestino pero existen cepas que pueden resultar patógenas causando generalmente infecciones (Cestari & Buster, 2017, pp. 56-87). Este tipo de bacilos con catalasa positivos, fermentan la glucosa y lactosa, sus especies son móviles y son capaces de producir vitaminas como la B y K (Lopez, 2014, pp. 24-29).

1.15 Factor de Protección Solar (FPS)

El Factor de Protección Solar indica las veces en la que el fotoprotector eleva la capacidad de defensa natural de la piel contra la formación de eritemas o envejecimiento prematuro, es decir nos proporciona información sobre la protección ante rayos UVB (Allorent & Petroustos, 2017, pp. 48-76).

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

Donde: FPS= Factor de Protección Solar
FC= 10 (factor de corrección)
EE (λ)= Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ
I (λ)= Intensidad del sol en la longitud de onda λ
Abs (λ)= Absorbancia de la solución en la longitud de onda λ

Figura 16-1. Ecuación de Mansur para determinar el FPS.

Fuente: (Adejumo et al., 2017, pp. 57-92)

Existen diversos métodos para poder determinar el FPS en donde un mismo producto o principio activos puede obtener varias designaciones en el factor de protección, estos sistemas son: FDA (estadounidense), SAA (australiano), DIN (alemán), COLIPA (europeo) (Young, Claveau, & Rossi, 2017, pp.54-61). En el año de 1994 se tomó la decisión de unificar el criterio del FPS, es así que se creó el Método de Verificación del Factor de Protección Solar frente a radiación UVB Y UVA de acuerdo con el estándar de COLIPA:

Tabla 2-1. Clasificación del FPS COLIPA.

Bajo	2, 4, 6
Medio	8, 10, 12
Alto	15, 20, 25
Muy alto	30, 40, 50
Ultra	Superior a 50

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Fuente: (Jovic et al., 2016. pp. 52-59)

1.16 Prueba de Irritación en Membrana Coriolantoidea de Huevo de Gallina (Huhner Embryonen Test (HET))

El método HET es una prueba de toxicidad que se realiza de manera rápida, sensible y económica que proporciona datos sobre embriotoxicidad, taratogenicidad, efectos sistémicos e inmunopatológicos, desarrollada en la membrana mucosa (Young et al., 2017, pp. 63-67). La membrana coriolantoidea de huevos incubados es una membrana vital en donde se pueden visualizar los efectores irritantes ante una exposición de líquidos o sólidos, la cual no reemplaza completamente a los ensayos en animales (Test de Draize), pero disminuyen lesiones o daños a mamíferos durante los proceso de experimentación (Yoon et al., 2017, pp. 28-41).

1.17 Ensayo de Micronúcleos.

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas que quedan apartados del núcleo durante la anafase en el ciclo celular y su tamaño oscila entre 1/3 y 1/16 (Xueyan, 2017, pp. 34-45). Este ensayo es una alternativa sencilla, rápida y con aportación de bajo recursos económicos que sirve para evaluar genotoxicidad de diferentes sustancias o exposiciones crónicas y agudas generalmente por pérdida de material genético (Xiao et al., 2016, pp. 43-58).

El objetivo principal de este método es proporcionar una información sobre el daño biológico, químico o físico que puede producir ciertas sustancias causando a futuro efectos mutágenos, carcinogénicos o teratogénicos debido al daño producido al ADN o a las proteínas encargadas de la división celular (Maeda, Seishi, 1996, pp. 51-72).

1.18 Análisis Estadístico

a) Anova de un factor

El análisis estadístico ANOVA de un factor tiene como objetivo comparar diversos grupos en una variable de carácter cuantitativo, es decir de forma general la Prueba T para dos muestras independientes. La hipótesis general de este test es que las medias de los tratamientos son iguales (Polonini, Brandão, & Raposo, 2014, pp.1-6).

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n = \mu$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \text{ para } i \neq j$$

Un término muy especial es el valor (p) referido como el mínimo significativo de una hipótesis, a este valor se lo compara con el nivel de significancia (α), es decir que si el valor de p es menor que α se rechaza la Hipótesis nula (Gonçalves et al., 2015, pp. 42-59).

b) Prueba de Tukey

El método de Tukey en ANOVA se usa para crear intervalos de confianza para las distintas diferencias entre los tratamientos, con el fin de controlar el error en un nivel α especificado. La veracidad de los resultados obtenidos se sujetan a distintos modelos o supuestos modelos que son: normalidad, homocedasticidad e independencia (El-Hawary, Yousif, Abdel Motaal, & Abd-Hameed, 2012, pp. 38-61).

Supuesto de Normalidad

La prueba de normalidad se puede analizar a través de diversas pruebas entre las que resaltan la prueba de Shapiro Wilk y Kolmogorov-Smirnov (Funari et al., 2012, pp. 32-65), estas tratan de examinar la hipótesis con el fin de determinar si los tratamientos siguen una determinada distribución normal:

H_0 : los datos siguen una distribución normal vs. H_1 : los datos no siguen una distribución normal

Supuesto de Homocedasticidad (Varianza Constante)

Se puede verificar varianza constante entre los tratamientos a través de las pruebas de Bartlett con el ensayo de Levene, en donde la hipótesis nula indica varianzas iguales o no (Proestos, Sereli, & Komaitis, 2006). Existe un reglamento en que proporciona la prueba de Levene que indica: no es necesario que los tratamientos tengan necesariamente distribuciones normales debido a que esta prueba hace pruebas más sólidas en poblaciones pequeñas.

Supuesto de Independencia

Cada tratamiento efectuado debe ser independiente con el fin de que ningún factor (salvo el tratamiento) pueda modificar la muestra en estudio. Se evalúa mediante una gráfica en donde en el eje horizontal se ubican los tratamientos u orden de corrida y en el eje vertical se expresan los residuos, en donde patrones aleatorios confirman independencia de las muestras (Yolanda Gilaberte, Coscojuela, Sáenz de Santamaría, & González, 2003, pp. 15-43).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Recolección de la Muestra

El material vegetal *Lippia triphylla* (Cedrón), fue recolectado en la parroquia Lizarzaburo, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, tramitándose el permiso dirigido hacia el Ministerio del Ambiente (Quito), siguiendo las órdenes del Ingeniero Marcelo Pino Director del Ministerio del Ambiente Chimborazo.

2.2 Lugar de Investigación

La investigación experimental se realizó en el Laboratorio del Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.3 Descripción botánica

Recolectado el material vegetal, se realizó la identificación taxonómica y botánica de *Lippia triphylla*, bajo el seguimiento del Ing., Jorge Caranqui, en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en donde se realizó el análisis con diferentes clases de la familia *Lippia*.

2.4 Control de Calidad de la droga cruda

2.4.1 Determinación del Contenido de Humedad

El posible exceso de agua puede generar en las drogas vegetales el desarrollo de bacterias, hongos e insectos lo que promueve a la hidrólisis de principios y componentes activos presentes en la misma.

Para su determinación se pesa 2g de la planta (material triturado) y se transfiere a una cápsula tarada, posteriormente se coloca en la estufa por 3 horas a 105 °C. Luego de cumplir el tiempo estimado se enfría a temperatura ambiente hasta que el peso se constante.

$$\%H = \frac{Ma - Mb}{Ma - Mc} * 100$$

Donde:

%H= porcentaje de humedad.

Ma= masa de la cápsula con la muestra vegetal antes del proceso de secado.

Mb= masa de la cápsula con el material vegetal desecado.

Mc=masa de la cápsula vacía

2.4.2 Determinación de Cenizas Totales

Para la realización del ensayo, se pesa 2 g de planta seca y triturada, se transfiere a un crisol previamente tarado. Se carboniza la muestra en un reverbero y posteriormente se lo introduce a la mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez que concluya este tiempo, se coloca la cápsula con cuidado en el desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, se pesa y se repite el proceso hasta obtener peso constante. Si el crisol contiene material o trazas de carbón se añaden gotas de ácido nítrico, se evapora y se continúa ingresándolo a estufa hasta que este quede perfectamente blanco.

$$\%Ca = \frac{M2 - M}{M1 - M} * 100$$

$$\%CT = \frac{Ca}{100 - H} * 100$$

Donde:

%Ca= porcentaje de cenizas en base hidratada.

M= masa de la cápsula vacía

M1= masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de incineración.

M2= masa de la cápsula con la muestra incinerada.

%CT= porcentaje de cenizas totales.

H= contenido de humedad.

2.4.3 Determinación de Cenizas Solubles en Agua.

El ensayo realiza por triplicado con la adición de 20 mL de agua destilada en el crisol, se procede a taparlo y se hierve por 5 minutos. Se filtra el restante y se lo coloca en el crisol inicial, posteriormente se incinera en la mufla a 700 °C durante dos horas.

Luego de cumplirse el tiempo se deja hasta que alcance temperatura ambiente y se procede a pesar hasta obtener peso constante.

$$\%Ca = \frac{M2 - M4}{M1 - M} * 100$$

$$\%CT = \frac{Ca}{100 - H} * 100$$

Donde:

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

M= masa de la cápsula vacía

M1= masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de incineración.

M2= masa de la cápsula con la muestra incinerada.

M4= masa del crisol con la cenizas insolubles en agua.

%CT= porcentaje de cenizas solubles en agua.

H= contenido de humedad.

2.4.4 Determinación de Cenizas Solubles en Ácido Clorhídrico

El ensayo se realiza por triplicado en la adición de 20 mL de ácido clorhídrico al 10%, se tapa el crisol y se hierve en un reverbero por 5 minutos. Posteriormente se filtra la solución y el restante se lava con agua destilada a continuación se carboniza el papel filtro en un reverbero y se incinera en la mufla a 700 °C por dos horas.

Cuando concluya el tiempo estimado se coloca en un desecador hasta que llegue a temperatura ambiente.

$$\%Ca = \frac{M2 - M}{M1 - M} * 100$$

$$\%CT = \frac{Ca}{100 - H} * 100$$

Donde:

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

M= masa de la cápsula vacía

M1= masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de incineración.

M2= masa de la cápsula con la muestra incinerada.

%CT= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base anhidra.

H= contenido de humedad.

2.5 Tamizaje Fitoquímico

Para el análisis del material vegetal se realizó la extracción con diferentes tipos de solventes, entre los cuales destacan: éter etílico, etanol y agua en donde se extrajeron metabolitos de acuerdo a su solubilidad. Adicionalmente se obtuvo extracto etéreo, etanólico y acuoso, con los cuales se procedió a realizar las diferentes pruebas fitoquímicas para determinar el tipo de metabolito presente de acuerdo al extracto:

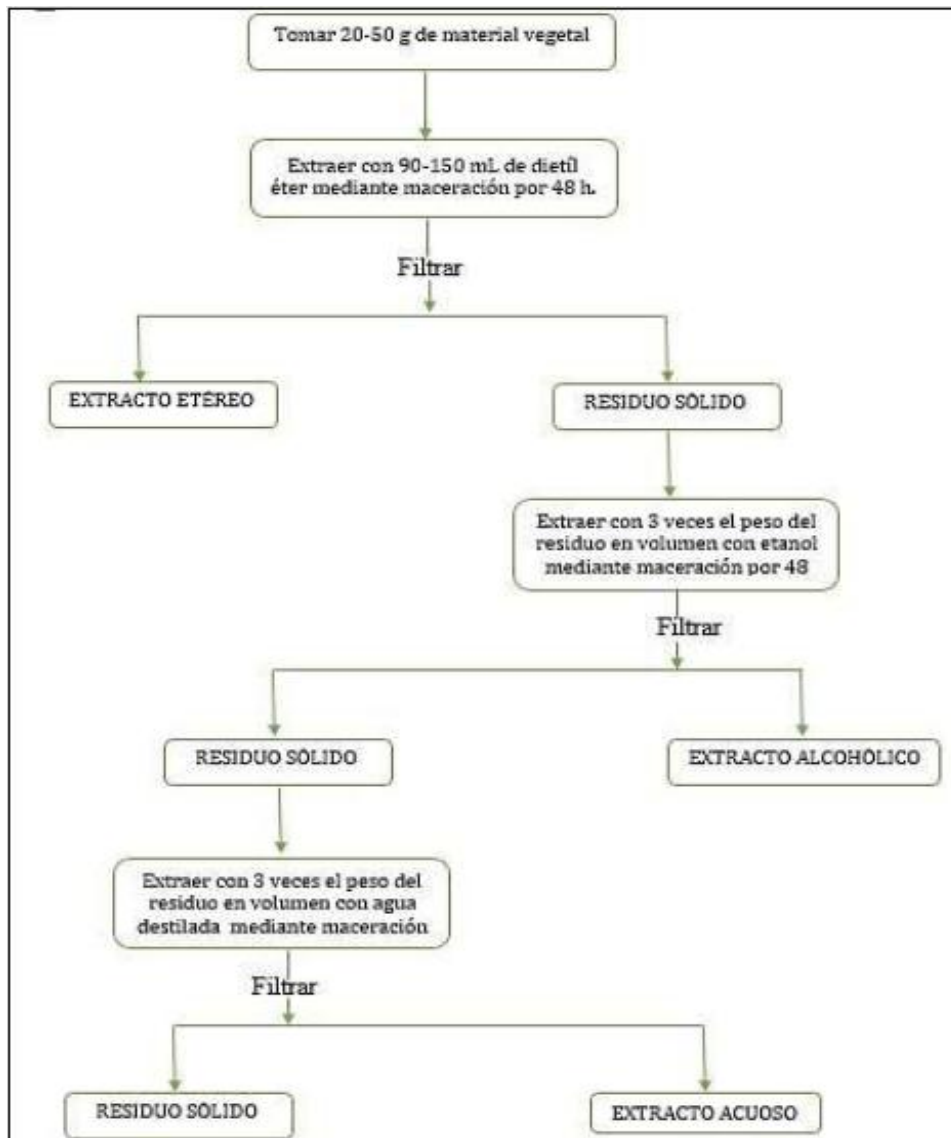


Figura 1-2. Tamizaje Fitoquímico.

Fuente:(Hwang et al., 2014, pp. 2-16)

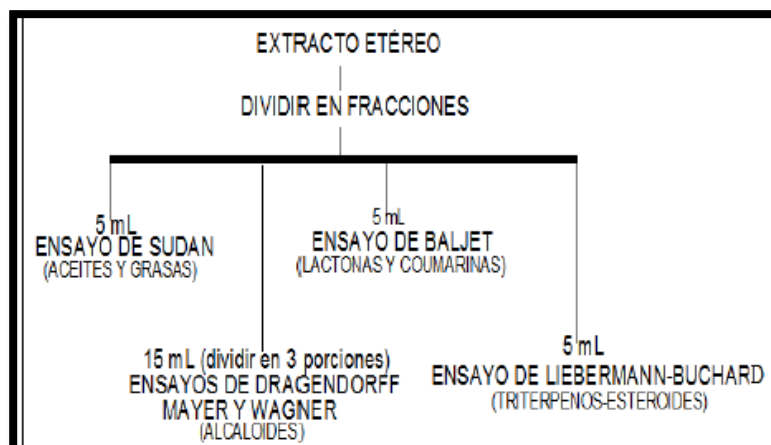


Figura 2-2. Ensayos Fitoquímicos del extracto Etéreo.

Fuente: (Hwang et al., 2014, pp. 2-16)

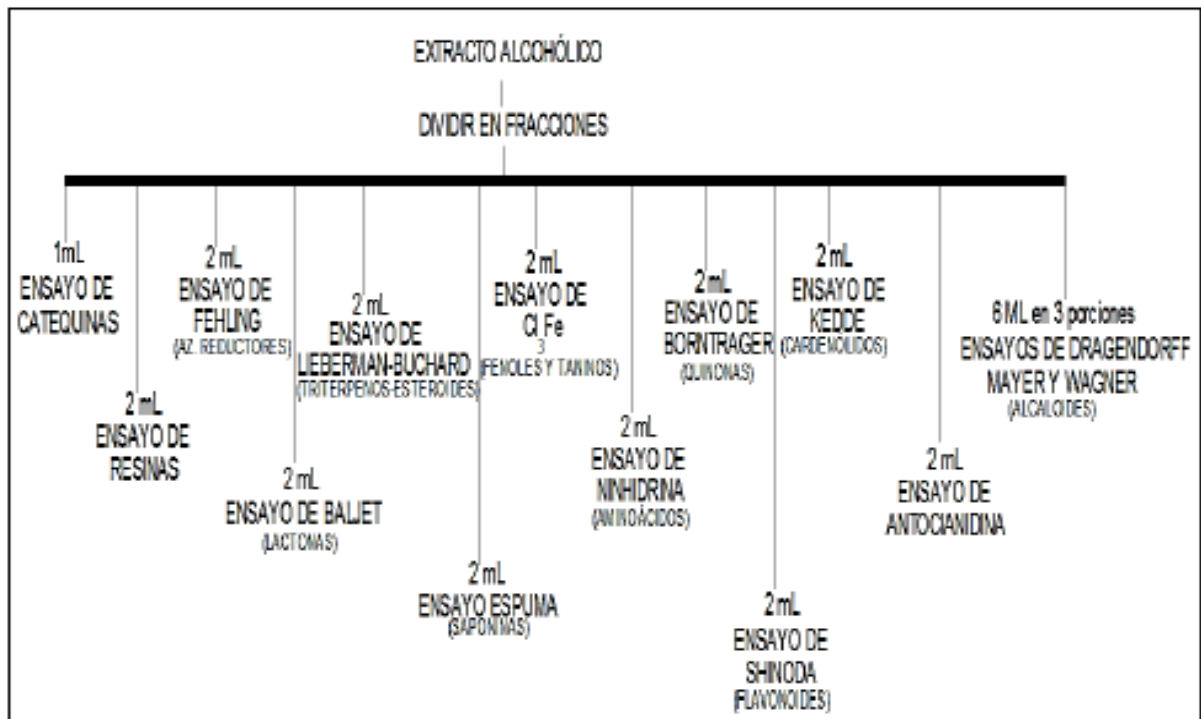


Figura 3-2. Ensayos Fitoquímicos del extracto Alcohólico.

Fuente: (Hennebelle, 2008, pp. 2-23)

Tabla 1-2. Ensayos a realizar para el Tamizaje Fitoquímico.

Ensayo	Metabolito
Sabor	Principios amargos
Alcaloides	Dragendorff, maer, wagner
Triterpenos /esteroides	Lieberman –buchard
Flavonoides	Shinoda
Fenoles y taninos	Cloruro férrico
Saponinas	Espuma
Azúcares reductores	Felhing
Compuestos grasos	Sudan ii
Cumarinas	Baljet
Catequinas	Catequinas
Resinas	Resinas

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Fuente: (Zengin, Mollica, 2017, pp. 45-69)

2.6 Obtención y Estandarización el extracto de *Lippia triphylla*

Se procede a colocar 100 g de planta previamente seca- triturada y se adiciona en relación 1:10 EtOH 70%, dejando macerar durante 72 horas. A continuación se procede a filtrar el extracto para posteriormente concentrar en el rotavapor. Luego de realizar este procedimiento se efectúa el método de maceración en frío (Liofilización) dejando actuar durante 72 horas.

Una vez obtenido el extracto seco se evalúa el rendimiento de extracción:

$$\%RE = \frac{PL}{P0} * 100$$

Donde:

%RE= porcentaje del rendimiento de extracción.

PL= peso del liofilizado obtenido

P0= peso de la planta del que partimos.

2.7 Cuantificación de Flavonoides Totales

Para realizar la cuantificación de flavonoides totales se toma una alícuota y se añade 4 ml de agua destilada conjuntamente con 0,3 ml de Nitrito de Sodio al 5%. Esperar un tiempo de 5 minutos y añadir 0,3 ml de Cloruro de Aluminio al 10% (vorterizar por 1 minuto + 5 minutos en completa oscuridad).

Posteriormente añadir 2ml de NaOH 1M y homogenizar, las lecturas se realizan a una medición de 510 nm (Hennebelle et al., 2008, pp. 39-46).

2.8 Cuantificación de Fenoles Totales

Para realizar la cuantificación de fenoles totales se toma una alícuota y se añade 15 ml de agua destilada conjuntamente con 1,25 ml del Reactivo de Folin. Esperar un tiempo de 8 minutos y añadir 3,75 ml de Carbonato de Sodio 7,5% y aforar a 25 ml con agua destilada (vorterizar por 1 minuto + 2horas en completa oscuridad).

Las lecturas se realizan a una medición de 765 nm (Hennebelle et al., 2008, pp. 34-39).

2.9 Capacidad Antioxidante

En la determinación de la capacidad antioxidante se toma 100 µL de una alícuota y se homogeniza con 3,9 ml de la solución de DPPH durante 20 minutos y posteriormente se incuba a una temperatura de 37°C.

Transcurrido este tiempo se procede a medir las absorbancias a una longitud de onda de 517nm.

Los radicales libres inhibidos DPPH (I%), se calculó mediante el autor Tohidi y col (Elemike, 2017).

$$I\% = \frac{ABS\ CONTROL - ABS\ MUESTRA}{ABS\ CONTROL} * 100$$

EN DONDE

I%= porcentaje de los radicales libres inhibidos

ABS CONTROL= absorbancia de la muestra control.

ABS MUESTRA= absorbancia del extracto de *Lippia triphylla*

A continuación, se determinó el IC 50 (Actividad Antioxidante) mediante la ecuación de la recta del extracto de *Lippia triphylla*.

2.10 Factor de Protección Solar

Para la realización del FPS se realizaron alícuotas a diferentes concentraciones diluidas en etanol al 70%, a continuación se realizó las diferentes lecturas desde 290 nm a 320 nm en intervalos de tiempo de 5 minutos.

La ecuación para la determinación de SPF generada por Mansur es la siguiente:

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

DONDE:

EE= indica el espectro de efecto en el eritema.

I= indica la intensidad del espectro solar

Abs= indica la absorbancia del producto con protección solar

CF= factor de corrección igual a 10

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

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

Figura 4-2. Valores de EE*I, establecidos
Fuente: (Barreto et al., 2014, pp. 12-29)

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

Figura 5-2. Clasificación del FPS definido por COLIPA
Fuente:(García-Bores et al., 2017, 101-165)

2.11 Estándar de Mcfarland

La escala de Mcfarland ayuda a tener un número aproximado de bacterias, mediante una suspensión de Cloruro de Bario y Ácido sulfúrico, produciendo un precipitado turbio de sulfato de bario. Mediante una curva de calibración el estándar corresponde a $1,5 \times 10^8$ células por ml.

McFarland Turbidity Standard No. 0.5	
Fórmula aproximada por 100 mL de agua purificada	
Ácido sulfúrico, 0,18 M	99,5 mL
Cloruro de bario, 0,048 M	0,5 mL

Figura 6-2. Preparación del Estándar McFarland
Fuente:(Pascual, Slowing, 2001, pp. 54-98)

2.12 Efecto Fotoprotector mediante Muerte celular inducida por radiación UVB

Para el análisis de fotoprotección por muerte celular inducida se utilizaron cepas *de Escherichia coli* (ATCC 25922), las cuales fueron activadas en Caldo cerebro corazón y aisladas en el medio de cultivo Müller Hinton. El extracto liofilizado obtenido se disolvió en etanol al 70% a distintas concentraciones (20 ppm, 200 ppm, 2000 ppm). Tanto los extractos como las bacterias (*E. coli* (ATCC 25922) Mcfarland), se ubicaron en tubos de cuarzo ejecutando el proceso de radiación en una cámara de radiación con una lámpara UVB maraca Philips, Broadbrand TL40w/12 RS a una dosis de irradiación de 0,60 J/cm² (García-Bores et al., 2017, 10-16).

Para la determinación de las colonias sobrevivientes, la porción de bacterias irradiadas se cultivaron en agar Müller Hinton y fueron incubadas a 37°C. Se contó el número de colonias en los distintos tiempos, ejecutando el proceso por triplicado.

2.13 Prueba HET CAM, mediante el método observacional o cualitativo

Se seleccionaron huevos fértiles, los cuales se incubaron por aproximadamente 10 días a condiciones normales de temperatura y humedad (37°C y 60% de humedad), en el día 10 se analizaron los huevos mediante lámparas de luz blanca, con la cual se identifica la aparición de venas de tamaño regular y la cámara de aire (Veras, H., y col., 2012, pp. 12-17)

Con la ayuda de una pinza se realizó un orificio en la zona de la cámara del aire previamente identificada, el orificio dio lugar a la membrana que cubre a la membrana coriolantoidea, la cual fue retirada de forma muy cuidadosa (Luepke, 2016, pp. 34-41).

Se adicionaron 300 µL de diversas alícuotas del extracto liofilizado, analizando durante 5 minutos la aparición de lisis, hemorragia y coagulación (Luepke, 2016, pp. 34-47).

Adicionalmente se realizando controles positivos: NaOH 0,1N y controles negativos: Agua Destilada para realizar la comparación entre el extracto y los controles (Luepke, 2016, pp. 34-57).

La fórmula para determinar el daño en la membrana de los huevos es la siguiente:

$$I.I. = ((301-TH)/300) \times 5 + ((301-TL)/300) \times 7 + ((301-TC)/300) \times 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación
 TH = Tiempo de aparición de hemorragia
 TL = Tiempo de aparición de lisis
 TC = Tiempo de aparición de coagulación

Figura 7-2. Formula para determinar el Índice de Irritación
 Fuente:(Veras, H., 2012, pp. 21-38)

Una vez obtenidos los Índices de irritación se compararan con la Figura. Donde se muestran las categorías que indican el tipo de irritabilidad del producto o en este caso el extracto.

RANGO HET CAM	CATEGORÍA IRRITANTE
0,0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

Figura 8-2. Clasificación para determinar que el producto es irritante.
 Fuente:(Barberán, 2016, pp. 53-54)

2.14 Prueba CAM-TBS, mediante el método de coloración con Azul Tripán

Para la determinación de la prueba HET CAM se procedió de la misma manera con el despeje de la membrana coriolantoidea mediante el uso de una pinza, posteriormente se colocó un anillo de goma de aproximadamente 18 mm u se adicionó 300 µL del extracto a diversas concentraciones (62.5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, y 500 ppm) dejando actuar por 20 segundos. La membrana se lavó con suero fisiológico y luego de colocó el colorante Azul Tripán durante 1 minuto. Al concluir el tiempo se lavó con agua destilada y se cortó cuidadosamente la membrana, la cual se colocó en un tubo con 5ml de Dimetilformamida (Oskay, Mustafa; Tamer, 2005, pp. 14-19).

Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, y se realizó la lectura de las absorbancias a 595nm. La detección del colorante que se absorbió indica el daño producido a la membrana coriolantoidea (Oskay, Mustafa; Tamer, 2005, pp. 14-19).

Para la determinación del potencial irritante se analizó con la siguiente fórmula:

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

Donde:
CA = Cantidad de colorante absorbido
b = Concentración de colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón) /mg de membrana.

Figura 9-2. Fórmula para determinación del potencial irritante.

Fuente:(Oskay, Mustafa; Tamer, 2005, pp. 43-52)

La comparación se ejecutó con los blancos positivos y negativos mediante la siguiente tabla de clasificación de irritabilidad:

CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO	CATEGORÍA
≤ 0,100 nmoles/mg	NO IRRITANTE
0,100 – 0,150 nmoles/mg	IRRITANTE MODERADO
≥0,150 nmoles/mg	IRRITANTE SEVERO

Figura 10-2. Categorización del Potencial Irritante prueba CAM-TBS

Fuente:(Argyropoulou, D, 2007, pp. 42-67)

2.15 Ensayo de Micronúcleos.

Se seleccionaron hablas (*Vicia faba*) de mejor calidad y tamaño estándar, a continuación se lavaron y almacenaron a 4 °C por 24 horas, previamente sumergidas en agua destilada. Al concluir este tiempo se quitó con cuidado la cáscara y se dejaron en germinación con algodón por 7 días, después de 7 días se seleccionaron las raíces primarias y se realizó un corte de aproximadamente 1- 2 cm para colocar en cada tratamiento (soluciones a concentraciones de 0, 05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, blanco positivo y negativo), durante 12, 24 y 48 horas (Costa, S, 2015, pp. 12-17).

Posteriormente dependiendo el tiempo transcurrido, se sacaron las raíces y se colocaron en solución de Farmer a 4°C por 24 horas; se enjuagó y se colocó en HCl 1N a baño maría 55°C por 5 minutos. Se lavaron y colocaron en ETOH 70% a 4°C por 30 min (Costa, S, 2015, pp. 12-23).

Finalmente se trataron las raíces con Ácido Acético al 45% por 30 min; luego se tiñeron con Orceína 1% y se realizaron finos cortes para observar en el microscopio (Costa, S, 2015, pp. 12-27).

Mil células fueron contadas e identificadas en su diferente fase mitótica, para calcular el índice de genotoxicidad se usaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{ÍNDICE MITÓTICO (IM) TOTAL} = \frac{\text{NÚMERO DE CÉLULAS EN CADA FASE}}{10000} * 100$$

$$\text{MICRONÚCLEOS (MCN)} = \frac{\text{NÚMERO DE CÉLULAS DE INTERFASE CON MCN}}{10000} * 100$$

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Control de Calidad de la droga Cruda

Tabla 1-3. Determinación del Control de Calidad de las Hojas de *Lippia triphylla*.

Ensayo	<i>Lippia triphylla</i>	Límites según la USP 35
CONTENIDO DE HUMEDAD	6,884 ± 0,89 %	14%
CONTENIDO DE CENIZAS TOTALES	11,827 ± 0,48 %	12%
CONTENIDO DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA	0,496 ± 0,43 %	7%
CONTENIDO DE CENIZAS SOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO	11,029 ± 0,51%	5%

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

3.1.1 Contenido de Humedad

El contenido de humedad determinado por la pérdida de masa del producto fue dado por el método gravimétrico por desecación de las hojas de *Lippia triphylla*, con un resultado de 6,884%, esto nos permite analizar que el valor se encuentra dentro de los rangos normales según la Farmacopea Española (14%). Miranda, 2000, indica que este porcentaje nos asevera que los problemas como la aparición de hongos, insectos, hidrólisis y daños enzimáticos como la degradación no van a afectar los metabolitos existentes en las hojas, lo que nos garantiza estabilidad durante el proceso de investigación. (Parodi et al., 2012, pp. 65-72)

3.1.2 Contenido de Cenizas Totales

El análisis de estudio por el método gravimétrico de cenizas totales nos indica generalmente la calidad de la droga, mediante la destrucción del material orgánico presente. El valor obtenido fue de 11,827%, indicativo de un contenido de material mineral normal.

Existe, en ciertos casos que la exposición a estos metales aumenta la producción de agentes antioxidantes (agente de estudio), lo que aumentaría el número de compuestos que evitan la oxidación. Por otro lado, estudios realizados en el Cedrón, indican que esta especie de plantas contienen mecanismos efectivos para la eliminación de dichos metales como: glutatión, metalotioneínas y fitoquelatinas. Algunos pueden unirse al metal para su posterior excreción o inhibición (Maeda, Seishi, 1996, pp.41-59).

3.1.3 Contenido de Cenizas Solubles en Agua

Se realizó la determinación del contenido de cenizas solubles en agua mediante el método gravimétrico, el valor obtenido fue de 0,496% lo que nos indica la presencia de metales alcalinos en menor proporción. Este resultado concuerda con USP 35 ya que especifica un valor máximo permisible del 7%,

Este tipo de cenizas corresponden a sales solubles y compuestos propios de las plantas generalmente usados, como por ejemplo el Potasio (K) el cual es indispensable para la supervivencia, procesos metabólicos y fotosíntesis de la planta.

3.1.4 Contenido de Ceniza Insolubles en HCl

Se realizó el análisis de cenizas insolubles en ácido clorhídrico para las hojas de *Lippia triphylla*, obteniendo un valor de 11,525%, el cual sobrepasa los límites especificados en la USP 35 (5%), este resultado confirma la presencia de metales pesados propios o adquiridos por medio de la tierra o agua, los cuales pueden ayudar a la formación de compuestos antioxidantes como medio de defensa de la planta. Hay que tener en cuenta que valores que sobrepasen los reglamentarios requieren análisis extra para determinar el tipo de toxicidad que puede causar al organismo o mejorar en la recolección y almacenamiento del material vegetal.

3.2 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje Fitoquímico se realizó con el objetivo principal de analizar los metabolitos secundarios presentes en *Lippia triphylla*, mediante reacciones cualitativas como colorimétricas y aparición de precipitado. Los extractos evaluados fueron en orden de polaridad: éter etílico, etanol y agua.

Dentro de los resultados obtenidos en el extracto etéreo se realizaron pruebas para alcaloides como Dragendorff, Mayer y Wagner, lo que demostró la presencia escasa o nula de estos principios activos. Con relación a la prueba de Sudan para aceites y grasas se obtuvo un resultado

positivo notorio ya que el Cedrón cuenta con abundantes aceites esenciales que le proporciona un aroma característico, entre ellos encontramos Geranial, Limoneno y Neral en su mayoría. Además existe la presencia de lactonas y cumarinas abundantes determinadas por la prueba de Balget y en menor proporción Triterpenos y Esteroides.

Por otro lado en el extracto etanólico se evidenció en poca cantidad: alcaloides, resinas y antocianidinas; en cambio compuestos como azúcares reductores, catequinas, lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, saponinas y compuestos fenólicos se evidenciaron en cantidades abundantes en el ensayo. Además en el extracto acuoso pruebas como Espuma y Fehling, concuerdan con las pruebas realizadas en el extracto alcohólico lo que confirma su existencia en las hojas de *Lippia triphylla*, pero pruebas de alcaloides resultaron negativas.

Finalmente, en el Extracto Alcohólico y Acuoso se demostró de manera sobresaliente la existencia de Flavonoides y Compuestos Fenólicos que resaltan en el efecto Fotoprotector ante la radiación Ultravioleta, mediante la prueba de Shinoda y Cloruro Férrico, lo que concuerda con la composición química. Dentro del análisis cualitativo para mejor visualización de la reacción se tuvo que retirar los compuestos Pigmentantes mediante un proceso de precipitación las clorofilas.

Tabla 2-3. Resultado del Tamizaje Fitoquímico de las hojas de *Lippia triphylla*.

ENSAYO	TIPO DE METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Aceite y grasa	(+++)	N/A	N/A
Dragendorff	Alcaloides	(-)	(+)	(+)
Mayer	Alcaloides	(-)	(+)	(-)
Wagner	Alcaloides	(-)	(+)	(-)
Balget	Lactonas-Cumarinas	Precipitado rojo (++)	(++)	N/A
Lieberman-Buchard	Triterpenos-Esteroides	Verde Oscuro- (+)	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	Compuestos Fenólicos	N/A	Verde Intenso (+)	Verde Intenso (+)
Boruntrager	Quinonas	N/A	(++)	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	(+++)	(+++)
Antocianidinas	Antocianidinas	N/A	(-)	N/A
Mucílagos		N/A	N/A	(-)
Nihidrina		N/A	(++)	N/A
(+++) Abundante	(++) Moderado	(+) Escaso	(-) No existe	N/A (No Aplica)

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

3.3 Estandarización y Rendimiento de Extracción.

Tabla 3-3. Resultado de la Estandarización y Rendimiento del extracto de *L. triphylla*.

ENSAYO	RESULTADO
Rendimiento de extracción	24%
Color	Verde-marrón
Aroma	Floral

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Se realizó la determinación del rendimiento de extracción del extracto etanólico de *Lippia triphylla*, con un resultado de 24%, además luego del proceso de liofilización se obtuvo un polvo color marrón- verde oscuro con un aroma específico a Cedrón, lo que nos indica la alta concentración de metabolitos presentes en la planta en especial de compuestos Aromáticos.

3.4 Cuantificación de Flavonoides Totales

La cuantificación de Flavonoides totales del extracto etanólico de *Lippia triphylla* se realizó mediante el método por espectrofotometría por quelación con Cloruro de Aluminio, tomando como referencia la ecuación de la recta del estándar de Quercetina: $A = 0,0014x + 0,0144$ con un R^2 de 0,999.

Los valores obtenidos de cada absorbancia se reemplazaron en la ecuación de la recta del estándar de quercetina obteniendo los resultados expresados en la siguiente tabla:

Tabla 4-3. Resultado de la Cantidad de Flavonoides Totales del extracto de *Lippia triphylla*.

FLAVONOIDES TOTALES		
SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco	g Equivalentes de Quercetina/100 g de extracto seco (%EQFT)
Extracto ETOH <i>Lippia triphylla</i>	4,864 ±0,05	0,486 ±0,11

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Luego de realizar los diversos cálculos, el contenido de flavonoides totales presentes en las hojas de *Lippia triphylla* fue de 4,864 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco, es decir 0,486 g Equivalentes de Quercetina/100 g de extracto seco (%EQFT). Este valor es de gran ayuda ya que se relaciona con los resultados que se han obtenido en los ensayos de muerte celular inducida y FPS, en donde la planta en estudio en concentraciones mínimas y produce un efecto Fotoprotector eficiente. Además hay que tener en cuenta que este valor puede aumentar elevando la concentración de partida o mejorando el sitio de recolección de la planta ya que a mayor altura más radiación recibe la planta y por ende mayor cantidad de flavonoides existirán.

3.5 Cuantificación de Fenoles Totales

La cuantificación de Fenoles Totales del extracto etanólico de *Lippia triphylla* se realizó mediante el método por espectrofotometría con el reactivo Folin Ciocalteu, tomando como referencia la ecuación de la recta del estándar de Ácido Gálico: $y = 0,0014x + 0,0144$ con un R^2 de 0,999.

Los valores obtenidos de cada absorbancia se reemplazaron en la ecuación de la recta del estándar de Ácido Gálico obteniendo los resultados expresados en la siguiente tabla:

Tabla 5-3. Resultado de la Cantidad de Fenoles Totales del extracto de *Lippia triphylla*.

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	FENOLES TOTALES	
	mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco	g Equivalentes de Ácido Gálico /100g de extracto seco (%EQFT)
Extracto ETOH <i>Lippia triphylla</i>	16,48 ±0,7	1,648 ±0,23

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

El contenido de fenoles totales presentes en *Lippia triphylla* fue de 16,48 mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco, es decir 1,648 g Equivalentes de Ácido Gálico /100g de extracto seco (%EQFT). Estudios recientes han demostrado que el efecto fotoprotector aumenta debido a que se produce un mecanismo de biosíntesis de compuestos fenólicos en la planta, efecto que puede ser usado ante radiaciones UVB especialmente.

Gimedo Eva, Doctora en Farmacia indica que la presencia de fenoles en el cedrón (*Lippia triphylla*) genera altos efectos antioxidantes, tanto para radicales libres como para metales; estas propiedades producen el efecto farmacológico como anticancerígeno y protector cardiovascular.

Además el efecto fotoprotector aumenta el proceso de biosíntesis en la planta, mecanismo que puede ser usado ante radiaciones UVB especialmente.

3.6 Capacidad Antioxidante

Tabla 6-3. Resultado de la Capacidad Antioxidante del Ácido Gálico.

Estándar	Actividad Antioxidante IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Valor de Referencia
		Óptimo (IC ₅₀ < 15 µg mL ⁻¹)
		Bueno 15 µg mL ⁻¹ < IC ₅₀ < 50 µg mL ⁻¹
Ácido Gálico	23,27 ± 1,63	Promedio 50 µg mL ⁻¹ < IC ₅₀ < 100 µg mL ⁻¹
		Débil IC ₅₀ ≥ 100 µg mL ⁻¹

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Tabla 7-3. Resultado de la Capacidad Antioxidante del extracto de *Lippia triphylla*.

Muestra en Estudio	Actividad Antioxidante IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Valor de Referencia
		Óptimo (IC ₅₀ < 15 µg mL ⁻¹)
		Bueno 15 µg mL ⁻¹ < IC ₅₀ < 50 µg mL ⁻¹
Extracto etanólico de <i>Lippia triphylla</i>	709,66 ± 41.03	Promedio 50 µg mL ⁻¹ < IC ₅₀ < 100 µg mL ⁻¹
		Débil IC ₅₀ ≥ 100 µg mL ⁻¹

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Se efectuó el método DPPH (2-difenil-1-picril hidrazilo) para la determinación de la capacidad Antioxidante del extracto etanólico de *Lippia triphylla* a través del efecto inhibidor del radical, el valor obtenido se reemplazó en la ecuación de la recta obteniéndose un resultado de $709,66 \pm 41.03$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) categorizado según los valores de referencia de Caneschi, C 2016 como Débil. En cambio el efecto de captador de radicales por parte el Ácido Gálico fue de Bueno ya que se obtuvo un valor de $23,27 \pm 1,63$. Estudios realizados en la Unidad Académica de Ciencias Químicas UTMACH manifiestas que mientras la concentración del extracto de *Lippia triphylla* (cedrón) es menor la capacidad antioxidante disminuye, esto concuerda con el efecto fotoprotector ya que a concentraciones mayores el efecto mejora.

3.7 Efecto Fotoprotector mediante Muerte celular inducida por radiación UVB

Se evaluó la actividad Fotoprotectora ante radiaciones UV-B mediante muerte inducida a *Escherichia coli* ATCC 25922, los resultados obtenidos se evaluaron en función de UFC/mL tanto para los Estándares como para el extracto etanólico de *Lippia triphylla*. Se aplicó el método de dilución para evaluar las colonias supervivientes en relación a diversos períodos de tiempo.

Tabla 8-3. Efecto fotoprotector del etilhexil metoxicinamato (OMC).

OMC TIEMPO (min)	BLANCO UFC/ml	20 ppm UFC/ml	200 ppm UFC/ml	2000 ppm UFC/ml
0	61000000 ($\pm 3605551,28$)	59000000 ($\pm 6082762,53$)	52666666,7 ($\pm 6806859,29$)	56666666,7 (± 4163332)
30	0	3333333,33 \pm 577350,269	6666666,67 ($\pm 1527525,23$)	18333333,3 ($\pm 2516611,48$)
60	0	0	5333,33333 ($\pm 1154,70054$)	22000 (± 2000)
90	0	0	0	17333,3333 ($\pm 3055,05046$)
120	0	0	0	8000 (± 2000)
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Tabla 9-3. Efecto fotoprotector del octildimetil-PABA.

PAD TIEMPO (min)	BLANCO UFC/ml	20 ppm UFC/ml	200 ppm UFC/ml	2000 ppm UFC/ml
0	52000000 (± 4000000)	50666666,7 (± 7505553,5)	55000000 (± 3464101,62)	52333333,3 (± 10214369)
30	0	3333333,33 (± 577350,269)	8666666,67 (± 1527525,23)	16000000 (±1000000)
60	0	2666,66667 (± 1154,70054)	10000 (± 2000)	18000 (±2000)
90	0	0	6666,66667 (± 3055,05046)	11333,3333 (± 3055,05046)
120	0	0	0	4666,66667 (±1154,70054)
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Tabla 10-3. Efecto fotoprotector del extracto etanólico de *Lippia triphylla*.

<i>L. triphylla</i> TIEMPO (min)	BLANCO UFC/ml	20 ppm UFC/ml	200 ppm UFC/ml	2000 ppm UFC/ml
0	49666666,7 (±6110100,93)	52333333,3 (±2516611,48)	46666666,7 (±3511884,58)	45666666,7 (±4041451,88)
30	0	3000000 (± 1000000)	7000000 (±1000000)	14000000 (±2645751,31)
60	0	0	7333,33333 (±1154,70054)	14000 (±4000)
90	0	0	0	5333,33333 (±1154,70054)
120	0	0	0	0
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

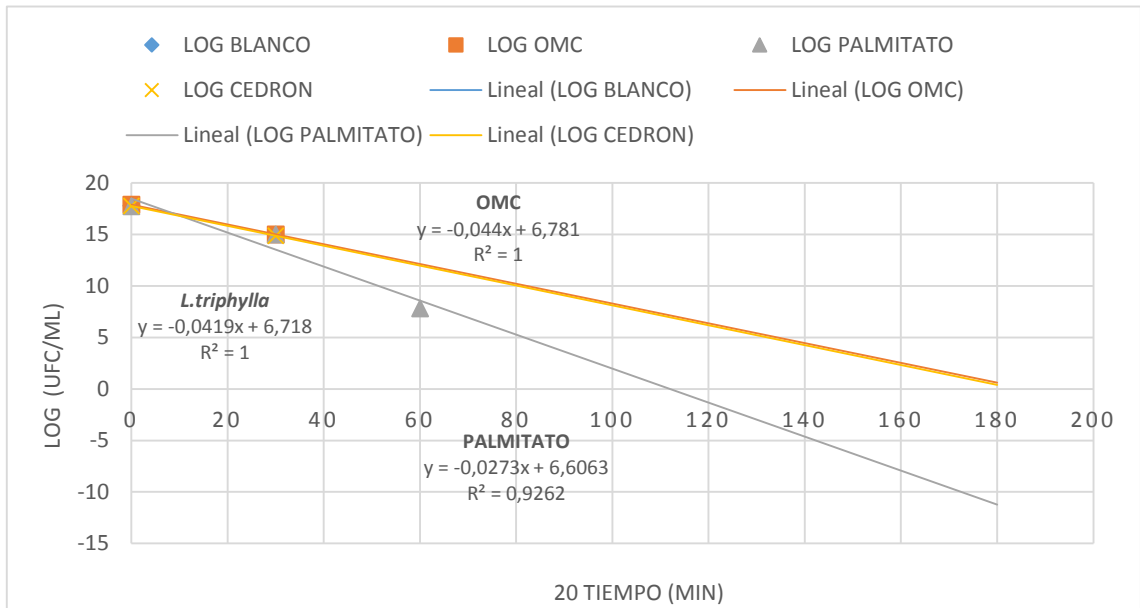


Gráfico 1-3. Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de bacterias *E. coli* por UVB. Blanco 20ppm, OMC 20ppm, Pamidato 20ppm, *Lippia triphylla* 20ppm. Realizado por: MANCHENO, María, 2018

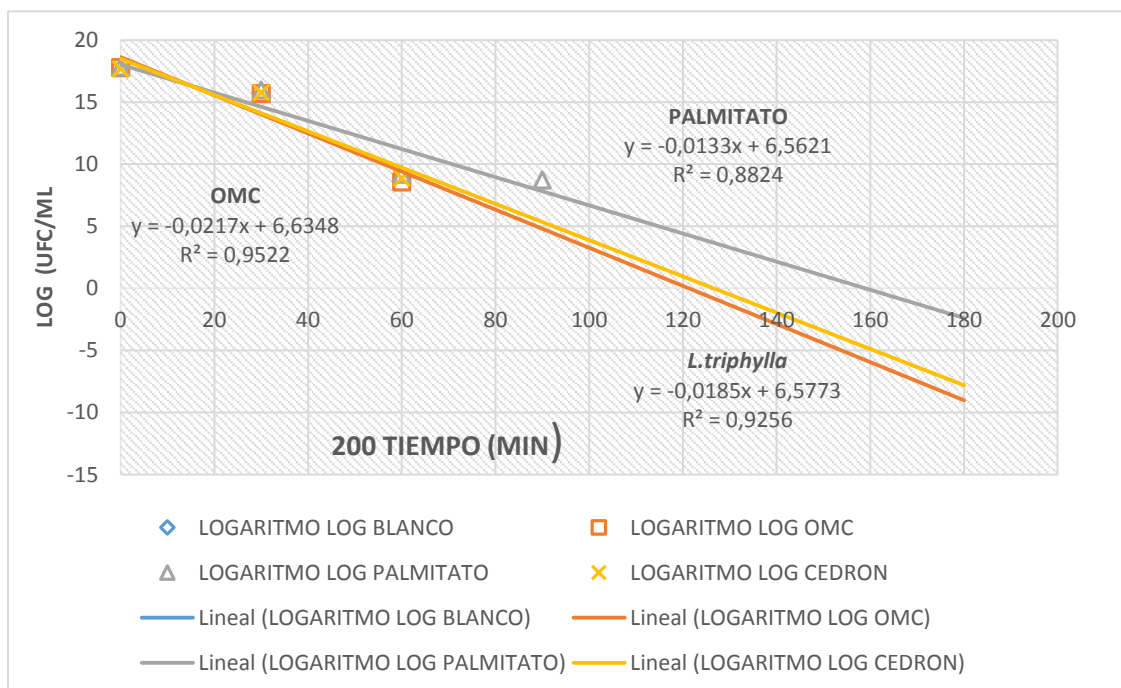


Gráfico 2-3. Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de bacterias *E. coli* por UVB. Blanco 200ppm, OMC 200ppm, Pamidato 200ppm, *Lippia triphylla* 200ppm. Realizado por: MANCHENO, María, 2018

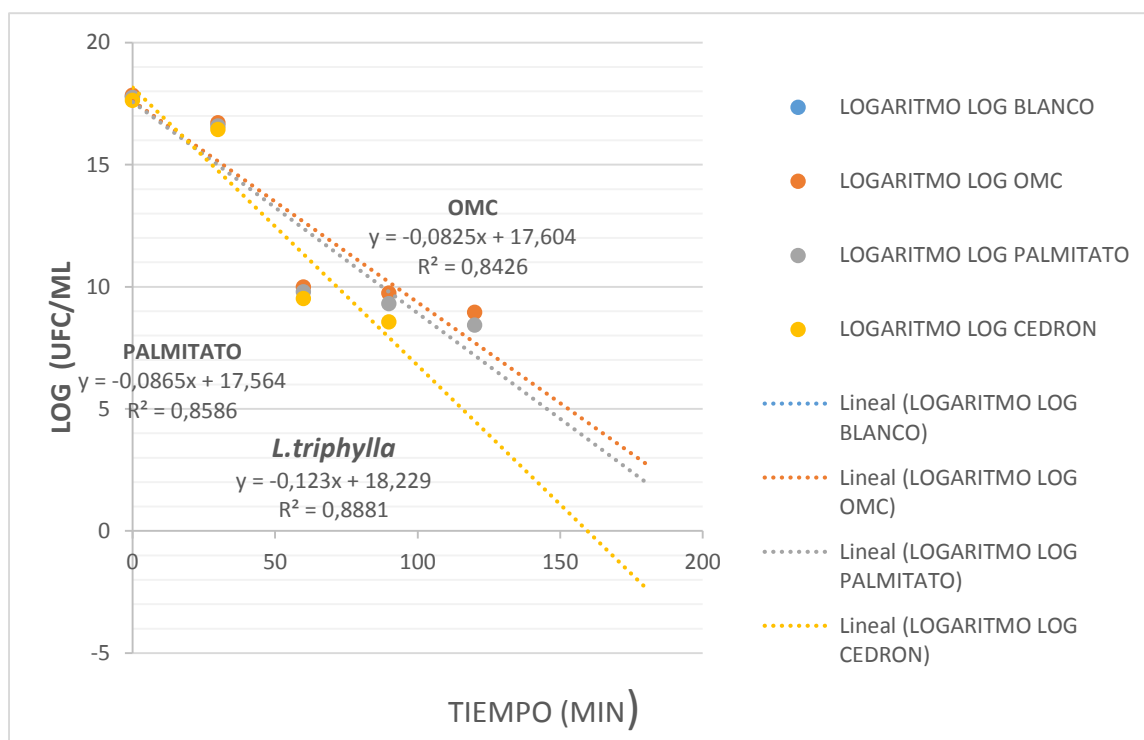


Gráfico 3-3. Efecto fotoprotector contra la muerte celular inducida de bacterias *E. coli* por UVB. Blanco 2000ppm, OMC 2000ppm, Pamidato 2000ppm, *Lippia triphylla* 2000ppm
Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Se realizó el ensayo de Irradiación a bacterias de *E. coli* ante la radiación UVB, la población bacteriana fue de $1,5 \times 10^8$ UFC; se colocaron en celdas de cuarzo tanto el blanco como las diversas concentraciones de extracto etanólico de las hojas de *Lippia triphylla* como los controles positivos en este caso Etilhexil metoxicinamato (OMC) y octilmetil-PABA (Pamidato).

Con relación al blanco, el tiempo de supervivencia de las bacterias fue menor a 5 minutos, debido a que no contaban con ninguna fuente de protección, por otro lado podemos observar que tanto el OMC como el PAD alcanzan actividades fotoprotectores superiores al extracto en estudio a tiempos superiores.

El extracto hidroalcohólico de *Lippia triphylla* protegen las poblaciones bacterianas de *E. coli* de manera similar como lo hacen los controles, durante los tiempos de 30 y 60 minutos a concentraciones de 20 y 200 ppm, además se pudo evidenciar un efecto elevado de protección celular ante la radiación UVB a concentraciones de 2000 ppm identificando bacterias vivas (UFC) hasta el tiempo de 90 min, indicando que si las concentraciones fueran superiores, el tiempo de fotoprotección de las hojas de *L. triphylla* fuera mayor.

En el tiempo de 120 min los controles positivos muestran aun el efecto fotoprotector lo que se relaciona con el FPS determinado por la ecuación de Mansur indicando un efecto protector alto y medio para estos estándares lo que no se relaciona con el extracto en estudio, debido que se

evidencia muerte celular en este tiempo. A los 150 y 180 minutos no existe supervivencia de bacterias tanto en los controles positivos como en los en las diversas concentraciones del extracto etanólico de *Lippia triphylla*.

Especies estudiadas de la familia *Lippia* como *L. dulcis* o *L. graveolens*, indican que contienen una elevada cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos cuando la planta es recolectada a una altura de 3000 a 3500 metros de altura, por lo que su efecto fotoprotector en estudios *in vivo* realizados en México no generaron enrojecimientos ni el quemaduras en zonas expuestas al sol. Esto nos proporciona información sobre la importancia del lugar de recolección de la planta, por lo que especies cultivadas en zonas andinas de *Lippia triphylla* mejorarían el efecto ante radiación UV (Ópez, Bigail, & Ontreras, 2014, pp. 2-18).

3.7.1 Análisis Estadístico del Efecto Fotoprotector mediante Muerte celular inducida por radiación UVB

Luego del análisis de los datos se determinó el área bajo la curva de los diferentes tratamiento tanto para los controles positivos Etilhexil metoxicinamato (OMC) y octilmetil-PABA (Pamidato), como par el extracto etanólico de *Lippia triphylla*. Para esto se examinaron los resultados para evidenciar tres puntos clave que se deben cumplir en estadística como son: normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos a las diversas concentraciones.

Además se aplicó el estudio con el test de ANOVA de un factor para determinar la diferencia entre los índices de fotoprotección y también identificar que sustancias se podrían usar como fotoprotector mediante un análisis estadístico.

Tabla 11-3. Factores Inter-Sujetos

Factores inter-sujetos		
	Etiqueta de valor	N
TRATAMIENTO 1	OMC 20	3
2	OMC 200	3
3	OMC 2000	3
4	PAMIDATO 20	3
5	PAMIDATO 200	3
6	PAMIDATO 2000	3
7	<i>L.triphylla</i> 20	3
8	<i>L.triphylla</i> 200	3
9	<i>L.triphylla</i> 2000	3

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Para el análisis de varianzas, se utilizaron 9 tratamientos para los cuales se realizaron tres repeticiones para cada Sustancia Fotoprotectora en diferente concentración.

Test de Anova de un factor

Tabla 12-3. Test Anova de un factor para el Índice fotoprotector

ABC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	805366824000000000	8	100670853000000000	8,185	,000
Dentro de grupos	221385165600000000	18	12299175866666700		
Total	1026751989600000000	26			

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

En la tabla de ANOVA se puede observar que el valor de significancia (p) es menor que 0,05 por lo tanto con un 95% de confianza se puede decir que existe diferencia entre los tratamientos OMC, PAD Y *L. triphylla* en el índice de fotoprotección, es decir al menos un par de tratamientos es diferente.

Prueba de Tukey

Tabla 13-3. Prueba de Tukey para el Índice fotoprotector.

HSD Tukey^a

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
PAMIDATO 20	3	860080000		
L.triphylla 20	3	875000000		
L.triphylla 200	3	910220000		
OMC 20	3	985000000	985000000	
OMC 200	3	990160000	990160000	
PAMIDATO 200	3	1085500000	1085500000	1085500000
L.triphylla 2000	3	1105580000	1105580000	1105580000
PAMIDATO 2000	3		1266020000	1266020000
OMC 2000	3			1401420000
Sig.		,211	,107	,051

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

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

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Una vez aplicada la prueba de Tukey, se han clasificado por grupos los tratamientos que en media poseen el mismo efecto fotoprotector. En este caso se observa que existen tres grupos; donde se muestran las diversas agrupaciones y diferencias entre los tratamientos, mostrando que las concentraciones de 2000 ppm contienen medias más elevada que el resto, indicando un índice de fotoprotección elevado con relación a las otras sustancias y su respectiva concentración.

Además cabe recalcar que, estadísticamente se pueden usar las sustancias PAD, OMC Y *L. triphylla* a 2000 ppm o PAD a 200 ppm para la elaboración de cualquier fotoprotector.

Prueba de Normalidad

Tabla 14-3. Prueba de Normalidad para el Índice fotoprotector.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Residuo para ABC	,126	27	,200*	,952	27	,242

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

- a. Corrección de significación de Lilliefors

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Tanto la prueba de Kolmogorov- Smirnov, como la de Shapiro-Wilk tienen valores de significancia (p) mayor que 0,05, por lo que el supuesto de normalidad se cumple.

Prueba de Homocedasticidad

Tabla 15-3. Prueba de Homocedasticidad para el Índice fotoprotector

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error^a

Variable dependiente:

F	df1	df2	Sig.
,617	8	18	,753

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

- a. Diseño : Intersección + TRATAMIENTO

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

A través de la prueba de LEVENE se pudo verificar que la varianza de los diferentes tratamientos son homogéneas por cuanto el valor de significancia (p) es mayor a 0,05

Prueba de Independencia

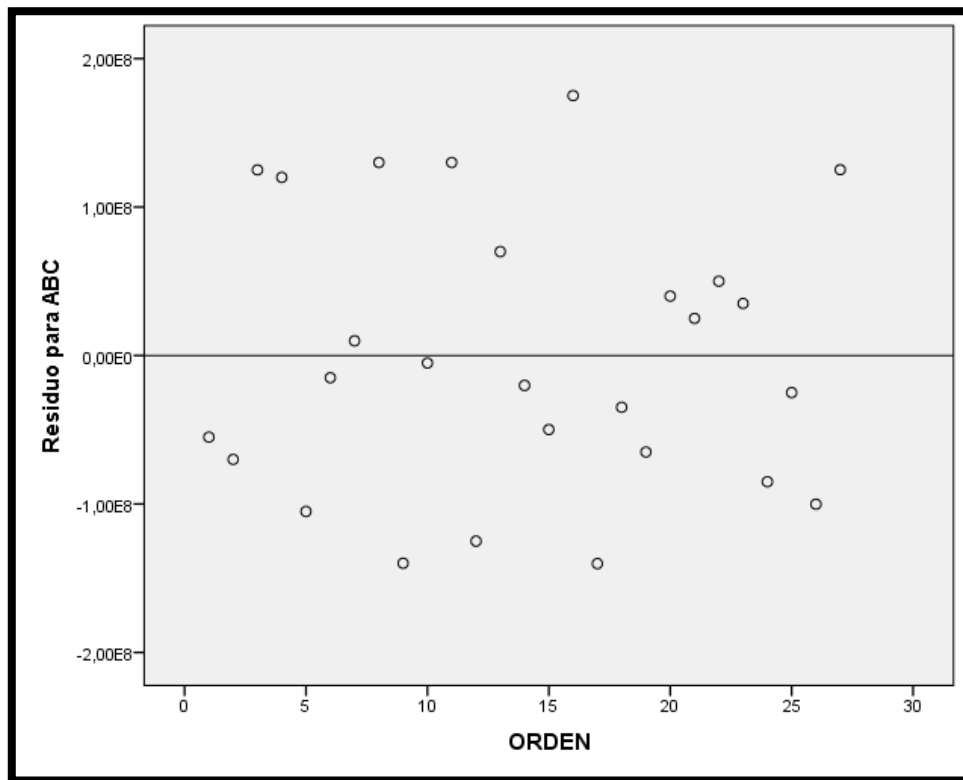


Gráfico 4-3. Prueba de Independencia para el Índice fotoprotector
Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Como se observa en la gráfica, los residuos se distribuyen de forma aleatoria alrededor del eje horizontal (0), por lo tanto se verifica el supuesto de independencia.

3.8 Factor de Protección Solar (FPS)

Tabla 16-3. Resultado del FPS: OMC, PAMIDATO, *Lippia triphylla*.

SUSTANCIA FOTOPROTECTORA	FPS (<i>in vitro</i>)
Etilhexil metoxicinamato (OMC)	13±0,15
Pamidato (PAD)	18±0,22
Extracto etanólico de <i>Lippia triphylla</i>	2±0,02

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

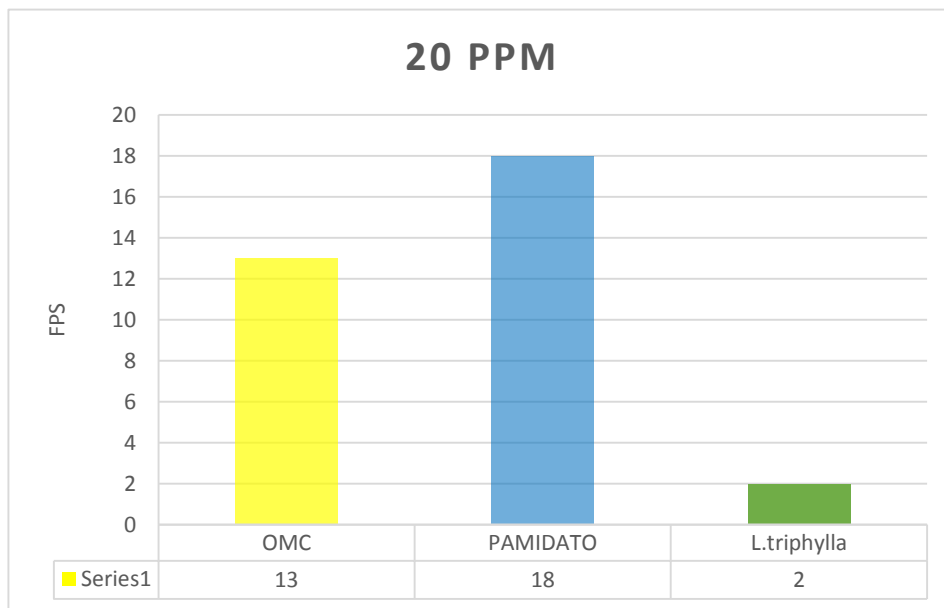


Gráfico 5-3. Comparación del FPS, OMC, PAMIDATO, *Lippia triphylla*.

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Se realizó el ensayo para determinar el Factor de Protección Solar (FPS) mediante la ecuación de Mansur, en donde se obtuvieron los siguientes resultados: para el control Pamidato el FPS fue de $18 \pm 0,22$; Etilhexil metoxicinamato un FPS de $13 \pm 0,15$ y para el extracto etanólico de *Lippia triphylla* el FPS fue de $2 \pm 0,02$. Estos valores fueron representados mediante un Gráfico de barras en donde se puede observar que el control PAMIDATO tiene un FPS ALTO, el OMC tiene un FPS MEDIO y el extracto de las hojas de *Lippia triphylla* tiene un FPS BAJO según la clasificación COLIPA en donde, además especifica que un filtro solar no debe ser menor a 15 y debe poseer actividad antioxidante. El FPS bajo de nuestro extracto puede deberse a que se realizó el análisis con una concentración mínima de 20 ppm, por lo que aumentando la concentración el resultado aumenta considerablemente.

El FPS *in vitro* se pudo comprar con el ensayo de Muerte celular inducida, donde los estándares (PAD y OMC) proporcionaron un factor de Fotoprotección elevado con relación al extracto de *Lippia triphylla*, concordando con los resultados obtenidos en el Factor de Protección Solar. Por otro lado al aumentar considerablemente la concentración (2000 ppm) de la planta en estudio, este efecto aumentó considerablemente con relación al número de colonias de *E. coli* sobrevivientes.

3.9 Prueba HET CAM, mediante el método observacional o cualitativo

Tabla 17-3. Resultado Prueba HET-CAM: OMC, PAMIDATO, *Lippia triphylla*.

Muestra	I.I (Índice de Irritación)	Valores de Referencia
NaOH (Control Positivo)	19,147 ± 0,27	0,0-0,9 No Irritante
Agua (Control Negativo)	0,00	1,0- 4,9 Irritante Leve
Lippia triphylla (62,5, 125, 250, 500 ppm)	0,00	5,0-8,9 Irritante Moderado 9,0-21,0 Irritante Severo

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Se calculó la capacidad irritante de los extractos etanólicos de *Lippia triphylla*, mediante la técnica *in vitro* alternativa HET CAM en membrana coriolantoidea de huevos de gallina. El análisis se determinó mediante fases de reacción como Hemorragia, Lisis y Coagulación expresadas según el tiempo de aparición. Posteriormente se ingresó en la fórmula y se determinó el efecto de irritación en donde el control positivo encabezado por NaOH obtuvo un valor muy elevado de 19,147 lo que según los valores de referencia indica un efecto Irritante Severo.

Por otro lado, tanto el control negativo como los extractos etanólicos de *Lippia triphylla* a sus diversas concentraciones obtuvieron un resultado de 0,00 es decir, se encuentran en el rango de catalogado como No Irritante. Esto no indica que el extracto en estudio puede ser usado para distintas formulaciones o aplicaciones dentro de la Industria Farmacéutica o Cosmética, ya que no causa ninguna lesión en los vasos sanguíneos del ojo (irritabilidad oftálmica) ni desnaturalización de proteínas extravasculares.

3.10 Prueba CAM- TBS, mediante el método de coloración con Azul Tripán

Tabla 18-3. Resultado Prueba CAM-TBS: OMC, PAMIDATO, *Lippia triphylla*.

Muestra	TBS (Cantidad de Colorante Absorbido)
NaOH (Control Positivo)	0,5919 ± 0,063
Agua (Control Negativo)	0,0182 ± 0,002
<i>Lippia triphylla</i> 62,5 ppm	0,0046 ± 0,003
<i>Lippia triphylla</i> 125 ppm	0,0090 ± 0,004
<i>Lippia triphylla</i> 250 ppm	0,0093 ± 0,003
<i>Lippia triphylla</i> 500 ppm	0,0100 ± 0,004

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Se evaluó la capacidad para producir irritación ocular mediante el método *in vitro* CAM-TBS a través de la medición de absorbancias por un espectrofotómetro, obtenidas gracias a la cantidad de colorante absorbido (Azul Tripán) por la membrana coriolantoidea. Se compararon los extractos de *Lippia triphylla* y los controles positivos (NaOH) y negativos (Agua) con una tabla de clasificación según las distintas categorías de Irritabilidad.

Para el control positivo el valor obtenido mediante el reemplazo en la curva de calibración fue de $0,5919 \pm 0,063$ indicativo de Irritante Severo ya que el valor sobrepasa los 0,150 nmoles/mg, además el control negativos y los diferentes extractos mostraron resultados menores o iguales a 0,100 nmoles/mg colocándose en la categoría de No Irritantes. Los resultados concuerdan con la prueba HET- CAM, asegurándonos que *Lippia triphylla* a concentraciones mínimas o elevadas no genera daños en los vasos sanguíneos ni causa cambios enzimáticos (desnaturalización de proteínas) en la membrana del ojo.

3.11 Ensayo de Micronúcleos

Tabla 19-3. Resultado Prueba Micronúcleos

Tratamiento	Índice Mitótico 48 horas	Índice de Micronúcleos 48 horas
Control Positivo	2,75 ± 1,70	2,25 ± 1,25
Control Negativo	27,25 ± 4,50	0
0,05%L. triphylla	28,25 ± 3,86	0
0,1%L. triphylla	28,50 ± 4,50	0
0,2%L. triphylla	29,50 ± 1,73	0
0,4%L. triphylla	30,00 ± 2,94	0

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Se identificaron las diversas alteraciones dentro de las fases de mitosis de la raíz del Haba (*Vicia faba*) mediante el ensayo de micronúcleos. Se analizaron los cambios celulares (1000 células contadas) del meristemo apical de la raíz previamente tratada tanto con el control Positivo (NaOH), control Negativo (Agua Destilada) y los extractos etanólicos de *Lippia triphylla* a las concentraciones de 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%.

El impacto celular causado por la toxicidad del control positivo fue muy notorio, con un resultados de 2,75 para el índice mitótico, mostrando un descenso en la proliferación celular, es decir la fase de mitosis se detiene y genera la producción de micronúcleos o partículas cromosomales presentes en el citoplasma indicativos de genotoxicidad, evidentes ya que se obtuvo un resultado para el Índice de Micronúcleos de $2,25 \pm 1,25$. Este valor nos muestra que el NaOH es un fuerte inhibidor de la mitosis por interacción al ADN o a proteínas reguladoras de la división celular.

Por otro lado tanto el control negativo como los diferentes extractos de *Lippia triphylla* mostraron un conteo celular en las distintas fases constante, es decir no causaron inhibición en la división celular, obteniéndose un rango entre 26 a 31 para el Índice Mitótico y la nula aparición de micronúcleos (contrario al control positivo).

En Argentina, Rafael Ricco, realizó un estudio con especies como *Lippia triphylla*, *Lippia integrifolia* y *Aloysia polystacha*, en donde confirma la ausencia de genotoxicidad en estas

especies de Verbenaceae, justificando mediante la Electroforesis con Bromuro de Etidio (BE) y Naranja de Acridina (NA) la viabilidad de 100 células por campo (Rafael, Marcelo, Alberto, & Marta, 2010). Este resultado confirma acerca del poder toxicológico de las hojas de *Lippia triphylla*, impulsando en un futuro al uso farmacológico o cosmético de la planta ya que no genera efectos carcinógenos, mutágenos o teratogénicos.

3.11.1 Análisis Estadístico para el ensayo de Micronúcleos

Luego del análisis de los datos de genotoxicidad se examinaron los resultados tanto para el Índice Mitótico como para el Índice de Micronúcleos con el fin de evidenciar tres puntos clave que se deben cumplir en estadística como son: normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos a las diversas concentraciones.

Además se aplicó el estudio con el test de ANOVA de un factor para determinar la diferencia entre el control Positivo y los extractos de *Lippia triphylla*, además se indica los tratamientos que pueden ser usados para posibles aplicaciones.

Tabla 20-3. Factores inter-sujetos para el análisis de Micronúcleos

TRATAMIENTO	Etiqueta de valor	N
1	0,05%L. triphylla	4
2	0,1% L. triphylla	4
3	0,2% L. triphylla	4
4	0,4% L. triphylla	4
5	Control positivo	4

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Para el análisis de varianzas se utilizaron 4 tratamientos y el control positivo, cada uno de los cuales tiene 4 observaciones (repeticiones).

Test Anova de un factor

Tabla 21-3. Test Anova de un factor para el análisis de Micronúcleos

IM

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2223,700	4	555,925	55,778	,000
Dentro de grupos	149,500	15	9,967		
Total	2373,200	19			

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

En la tabla de ANOVA se puede observar que el valor de significancia (p) es menor que 0,05, por lo tanto con un 95% de confianza se puede decir que para el Índice Mitótico y el Índice de Micronúcleos en al menos un par de tratamientos es diferente

Prueba de Tukey

Tabla 22-3. Prueba de Tukey para el análisis de Micronúcleos

IM

HSD Tukey^a

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control positivo	4	2,75	
0,05% L. triphylla	4		28,25
0,1% L. triphylla	4		28,50
0,2% L. triphylla	4		29,50
0,4% L. triphylla	4		30,00
Sig.		1,000	,931

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Una vez aplicada la prueba de Tukey, se han clasificado por grupos los tratamientos que en media poseen el mismo índice mitótico. En este caso se observa que existen dos grupos; el primero, donde está contenido el control positivo y el segundo donde se encuentran los tratamientos 0,05-0,1-0,2-0,4% del extracto EtOH de *Lippia triphylla*.

Además como los tratamientos del extracto EtOH de *Lippia triphylla* estadísticamente tiene media iguales, la utilización de cualquiera de ellos no genera toxicidad para posibles aplicaciones.

Prueba de Normalidad

Tabla 23-3. Prueba de Normalidad para el análisis de Micronúcleos

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
IM	,278	20	,000	,719	20	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Tanto la prueba de Kolmogorov- Smirnov, como la de Shapiro Wilk tienen valores de significancia (p) menores que 0,05, por lo que el supuesto de normalidad no se cumple.

Supuesto de Homocedasticidad

Tabla 24-3. Prueba de Homocedasticidad para el análisis de Micronúcleos

Variable dependiente:

F	df1	df2	Sig.
1,664	4	15	,210

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Diseño : Intersección + TRATAMIENTO

Realizado por: MANCHENO, María, 2018

A través de la prueba de LEVENE se puede verificar que la varianza de los diferentes tratamientos son homogéneas por cuanto el valor de significancia (p) es mayor a 0,05

Supuesto de Independencia

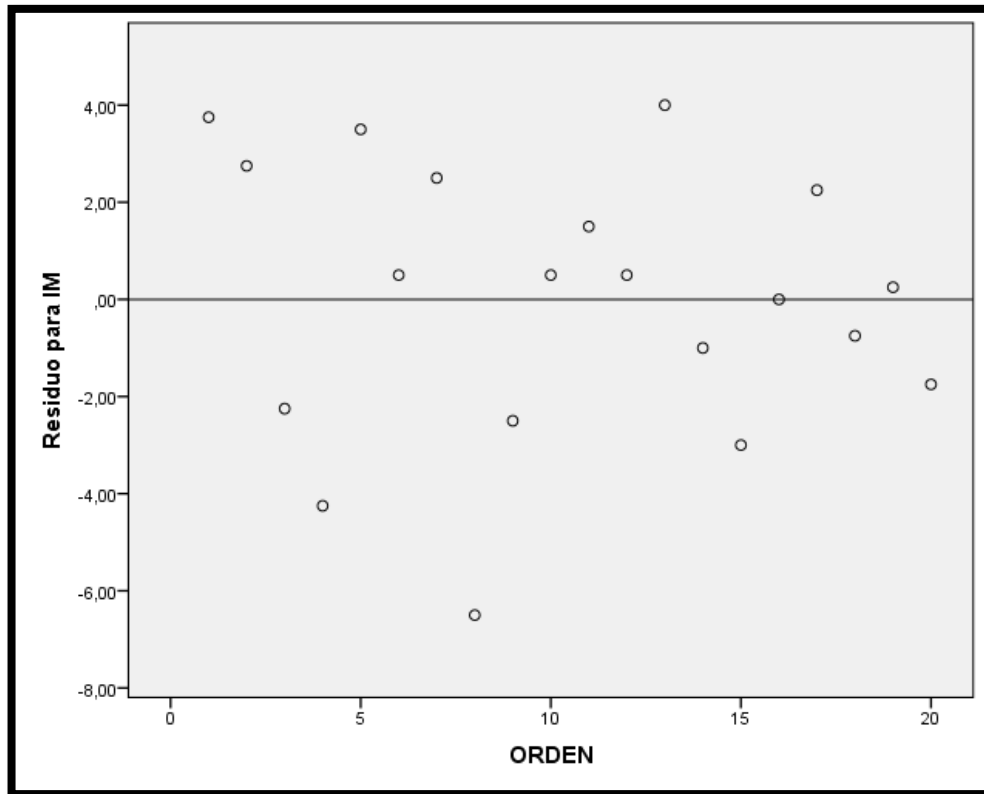


Gráfico 6-3. Prueba de Independencia para el Índice de Micronúcleos.
Realizado por: MANCHENO, María, 2018

Como se observa en la gráfica, los residuos se distribuyen de forma aleatoria alrededor del eje horizontal (0), por lo tanto se verifica el supuesto de independencia.

CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lippia triphylla* presentó, a través del método de muerte celular inducida en cepas de *E. coli* ATCC 25922 por exposición a radiación UVB un efecto fotoprotector elevado a concentraciones de 2000 ppm, en comparación a los extractos a concentraciones de 20 y 200 ppm protegiendo de forma eficaz a las bacterias hasta los 90 minutos, concluyendo que a mayor concentración mejor actividad fotoprotectora. Además, los estándares de etilhexil metoxicinamato (OMC) y octildimetil-PABA (Pamidato) a concentraciones de 2000 ppm demostraron un efecto fotoprotector hasta los 120 minutos
2. La determinación del Factor de Protección (FPS) mediante la ecuación de Mansur se realizó tanto para los estándares: etilhexil metoxicinamato (OMC) y octildimetil-PABA (Pamidato), como para el extracto liofilizado de *Lippia triphylla* a la concentración de 20 ppm demostrando que octildimetil-PABA (Pamidato) tiene un FPS: ALTO, etilhexil metoxicinamato (OMC) un FPS: MEDIO y el extracto de *Lippia triphylla* un FPS BAJO según la clasificación de COLIPA.
3. En el análisis de Irritación Ocular de los extractos de *Lippia triphylla* se realizaron dos tipos de ensayos alternativos *in vitro* del Test de Draize. El primer método usado fue el ensayo HET CAM en donde el extracto en estudio no generó reacciones de Hemorragia, Lisis o Coagulación por lo que fue catalogado como No Irritante según los valores de referencia especificados; por otro lado el segundo método fue el ensayo CAM-TBS basado en la absorción del colorante Azul Tripán, los resultados menores a 0,100 nmoles/mg obtenidos colocaron al extracto de las hojas de *Lippia triphylla* como No Irritante según las categorías de Irritabilidad. Esto nos asegura que el extracto a concentraciones bajas o elevadas no causa daños en los vasos sanguíneos oftálmicos ni desnaturalización de las proteínas de la membrana del ojo.
4. Se determinó la genotoxicidad del extracto de *Lippia triphylla* utilizando el ensayo de micronúcleos en *Vicia faba* variedad minor, indicando que el extracto en estudio no causó inhibición en la división celular ya que el Índice Mitótico fue constante en comparación al control positivo (NaOH), además, no se apreció la presencia de micronúcleos por lo que el extracto de *Lippia triphylla* a concentraciones bajas o elevadas no causa alteración en el ADN ni en procesos de división celular por ende se descarta futuros efectos carcinógenos, mutágenos o teratogénicos.

RECOMENDACIONES

1. Para los ensayos de control de calidad de la droga cruda los materiales deben estar limpios y tarados para que los resultados no varíen y garanticen calidad en el estudio.
2. En el ensayo de muerte celular inducida con *E. coli* es esencial que los materiales este limpios, además la suspensión de bacterias debe ser lo más similar posible que el estándar de Mcfarland para establecer homogeneidad durante el pipeteo.
3. Las colonias de *E. coli* deben sobrepasar los 15 días de incubación para obtener colonias vivas y no falsos positivos o negativos.
4. Es recomendable que para estudios que requieran sustancias de fácil oxidación ventanales que eviten la entrada de luz evitando así el desperdicio durante el ensayo.
5. Dentro de los ensayos de toxicidad se recomienda la selección pronta de los huevos, debido a que no todos son fértiles y esto demora la realización de los ensayos, además evitaremos el desperdicio de materiales y sustancias.
6. Se recomienda seguir con los estudios de fotoprotección y toxicidad de especies vegetales, debido a que muchos de ellos tienen propiedades protectoras ante radiación UVB lo que beneficia a nuestro país ya que Ecuador es uno de los principales con elevados índices de radiación UV, causando un impacto ante la aparición de enfermedades cancerígenas en la sociedad.

BIBIOGRAFÍA

ADEJUMO, A. Exploration of solar radiation data from three geo-political zones in Nigeria. [en línea]. 1a. ed. Valencia, Elsevier España, 2017 pp. 13, 60–68. [Consulta 2017-11-19]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.017>

ALBORGHETTI, G. Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales : un estudio experimental en ratones. [en línea]. Brazilian Journal of Anesthesiology (Edicion En Espanol), España, 2015 pp. 65, 21–26. [Consulta 2017-11-27]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjanes.2013.07.008>

ALLORENT, G., & Petroutsos, D. Photoreceptor-dependent regulation of photoprotection. [en línea]. Current Opinion in Plant Biology, México, 2017 pp. 37,102–108. [Consulta 2017-12-17]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.016>

ARGYROPOULOU, C. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. [en línea]. Biochemical Systematics and Ecology, Lima, 2007 pp. 35(12), 831–837. [Consulta 2017-12-11]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.07.001>

BARRETO, H. M. Light-mediated antibacterial activity of *Lippia organoides* H.B.K. in vitro. [en línea]. Photochem. Photobiol. Sci., Buenos Aires, 2014 pp. 13(12), 1650–1654. [Consulta 2017-11-17]. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C4PP00334A>

BATLLE, C. Factor de protección solar [en línea], vol. 35, (2005), pp. 201-235. [Consulta 2017-12-21]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.07.001>

BERENGUST, G. Fotoeducación Fotoprotección. [en línea], vol. 65, (2013), pp. 14-25. [Consulta 2018-01-14]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.07.001>

CESTARI, T., & Buster, K. Photoprotection in specific populations: Children and people of color. [en línea]. Journal of the American Academy of Dermatology, Brasil, 2017 pp. 76(3), 81–87. [Consulta 2018-01-27]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.09.039>

CLAVEAU, J. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. Archivos American Academy of Dermatology. [en línea], 1a. ed. Americana 2014 pp. 12-13 [consulta: 2017-09-01]. disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.09.038>

COSTA, E; & Correa, O. Determinacion del factor de proteccion solar de dos protectores solares elaborados eh un recetario magistral. [en línea], vol. 26, (2007), pp. 567–570.

COSTA, S; & Branco, A. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. [en línea] *Revista Brasileira de Farmacognosia, Brasil*, 2015 pp. 25(4), 413–418. [Consulta 2018-02-14]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.013>

CREUS, E. Compuestos fenólicos [en línea], vol. 23, (2004), pp. 80–84. [Consulta 2018-02-15].

DURO, E. El sol y los filtros solares. [en línea], vol. 13, (2003), pp. 159–165. [Consulta 2018-03-17]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2011.12.001>

EL HAWARY . Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. [en línea]. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 2012 pp. 50(1), 1–6. [Consulta 2018-02-01]. Disponible en: [//doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.013](https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.013)

ELEMIKE, E; & Nnaji, N. J. Phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extracts of *Lippia citriodora*: Antimicrobial, larvicidal and photocatalytic evaluations. *Materials Science and Engineering C*, vol. 75, (2017), pp. 19–27. [Consulta 2018-03-16]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.161>

FARMACÉUTICOS. Guía de Protección Solar. Ministerio de Sanidad Y Consumo. [en línea] (2014). [Consulta 2017-11-17].

FUNARI, C. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia species* (Verbenaceae) from Brazil [en línea]. *Food Chemistry*, 2012 pp. 135(3), 2086–2094. [Consulta 2018-04-07]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.077>

GARCIA, A; & Flores-Maya. *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis [en línea] *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 2017 pp. 167, 72–81. [Consulta 2018-05-03]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.014>

GILABERTE, Y; & González, S. Fotoprotección. *Actas Dermo-Sifiliograficas* [en línea], 2003 [Consulta 2017-11-17]. Disponible en: [ww.actasdermo.org/es/fotoproteccion/articulo/13048173/](http://www.actasdermo.org/es/fotoproteccion/articulo/13048173/)

GILABERTE, Y. Novedades en Fotoprotección [en línea], Elsevier, 2010, Lima, pp. 101(8), 659–672. [Consulta 2018-02-23]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2010.04.003>

GONCALVES, K; & Raposo, B. Assessment of the Photoprotective Activity of *Lippia Species* from Brazil and Their use as Single UV Filters in Sunscreens. [en línea] *Journal of Young Pharmacists*, 2015, Valecia, pp. 7(4), 368–372. [consulta 2018-04-23]. Disponible en: <https://doi.org/10.5530/jyp.2015.4.11>

HENNEBELLE, T; & Bailleul, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. [en línea] Journal of Ethnopharmacology, 2008, Alemania, pp. 116(?) 211–222. [Consulta 2018-04-09]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.04>

HWANG, E. Gallic Acid Regulates Skin Photoaging in UVB- exposed Fibroblast and Hairless Mice [en línea] España, Elsevier, 2014, pp. 1778–1788. [Consulta 2018-04-13].

IIDA, Y. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla* [en línea] Perú, Elsevier, 2008, pp. 1, 101–106. [Consulta 2017-11-17]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0197-9>

INOCENTE, A; & Malla, J. H. Actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una loción y gel elaborados con extracto estabilizado de *camu camu* [en línea]. 2014. pp. 80(1), 65–77. [Consulta 2017-11-17].

JOVIC, S; Nedic, B. Solar radiation analyzing by neuro-fuzzy approach. Energy and Buildings [en línea]. 2016, pp. 129, 261–263. [Consulta 2018-05-01]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2016.08.020>

LOGROÑO, P. Guía para la evaluación genotóxica de cuerpos de agua utilizando células de raíces de cebollines. [en línea] Ecuador, 2018. Ministerio de Medio Ambiente y Agua, pp. 1–31. [Consulta 2017-11-17].

LOPEZ, E. Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes [en línea], Elsevier 2014, pp. 23-28. [Consulta 2018-02-02].

LUEPKE, N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. [en línea] Revista: Food and Chemical Toxicology, 1985, pp. 23(2), 287–291. [Consulta 2018-04- 6]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4)

MCCONNELL, H; & Zhang, H. The improved Allium / Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants [en línea] Argentina, 1995, pp. 334, 185–195. [Consulta 2017-10-13].

MAEDA, E. Acteoside as the Analgesic Principle of Cedron (*Lippia triphylla*) [en línea], Revista Peruvian Medical Plant. J. Vet. Med. Science, 1996, Perú, pp. 58(5). 481–484. [Consulta 2018-12-17]. Disponible en: <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>

MASKE, P; & John, I. In vitro determination of sun protection factor and chemical stability of *Rosa kordesii* extract gel. [en línea] Journal of Pharmacy Research, España, 2013, pp. 7(6), 520–524. [Consulta 2018-09-31]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.05.021>.

MEJ, J; & Mej, P. Photo-protection : Biochemistry mechanism , the basis to improve sunscreens [en línea] Elsevier, 2014, España, pp. 12(52), 272–281. [Consulta 2018-05-29].

NACIONAL-BIOQUÍMICA. 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], Elsevier, 2015, Lima, pp. 23-29. [Consulta 2017-09-21].

ÓPEZ, M. & Ontreras, A. Anatomía de Hoja y Tallo de Verbenaceae medicinales empleadas en México, [en línea], Elsevier, 2014, México, pp. 92(4), 469–480. [Consulta 2017-12-21].

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Índice UV Solar Mundial [en línea], vol. 16, (2003), pp. 1–34. [Consulta 2018-01-26].

OSKAY,U. Antimicrobial Activity of the Leaves of *Lippia triphylla*. [en línea], vol. 63, (2005), pp. (63) 57–94. [Consulta 2018-05-11].

PAPER, C. Biomarcadores de dano genetico [en línea], UNA, vol. 94, (2015), pp. (63) 57–94. [Consulta 2018-05-23]. Disponible en:<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2901.4164>

PARODI, T. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) [en línea], Revista: Biochemistry and Physiology, 2012, pp. 155(3), 462–468. [Consulta 2018-03-27]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.003>

PASCUAL, M; & Villar, A. Lippia: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review [en línea], Journal of Ethnopharmacology, 2001, Elsevier, pp. 76(3), 201–214. [Consulta 2017-11-24]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)

POLONINI, H. A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter. [en línea], vol. 19, (2014), pp. (23) 75–95. [Consulta 2017-11-17]. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C4RA11577E>.

PROESTOS, C; & Komaitis, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS [en línea], Revista Food Chemistry, Chile, 2006, pp. 95(1), 44–52. [Consulta 2017-11-17]. Disponible en:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.016>

QU, I; & Km, C. Determinación de actividad antioxidante en extractos acuosos de cedrón (*Aloysia triphylla*), [en línea], vol. 1, 2016, pp. (1), 824–829. [Consulta 2018-03-31].

QUIRANTES-PINÉ, R; & Fernández-Gutiérrez, A. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. [en línea] Revista: Phytomedicine, España, pp. 20(12), 1112–1118. [Consulta 2018-02-17].

RADICE, M. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters [en línea], *Revista Fitoterapia*, 2016, España, pp. 114, 144–162. [Consulta 2017-12-11]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>

RICCO, R. Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae) [en línea], Elsevier, 2010, pp. 12-35. [Consulta 2017-11-17]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>

RAFFA, D. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal* [en línea] pp. 22(1). (1998). [Consulta: 2017-09-03]. disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034>

RIVERA, E. Patrón de Turbidez BBL preparadp McFarland Turbidity Standard. *Revistas BD*. [en línea], vol. 2 n. 1(1998), pp. 305–310. [Consulta: 2018-03-24]

RODRÍGUEZ G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, [en línea] pp. 44(5). (2016). *Revista Peru Med Exp Salud Pública*, [Consulta: 2018-02-05].

ROJAS, J. Efecto del Aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (Cedrón) sobre *Trypanosoma cruzi* En Ratones. [en línea] pp. 29(1), 61–68 (2012). *Revista Peru Med Exp Salud Pública*, [Consulta: 2018-02-05]

SOCORRO, S. La Prueba de Micronúcleos en Sangre como Bioindicador de Genotóxicos. [en línea] (2015), Archivado en España sociedad de Cataluña. [Consulta: 2017-10-25].

SOLCA, Incremento de la Sobrevida de Cáncer en Ecuador: 1995-2009. *LANCET*, 1. Retrieved from, [en línea] (2013), Guayaquil -Ecuador. [Consulta: 2017-12-05]. disponible en: <http://www.estadisticas.med.ec/Publicaciones/BoletinEstudiodeSobrevidaencancerCONCORD.pdf>

DEVUELGR, F. Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu , mediante el método Het Cam., 13(2). [en línea] (2013), pp. 52-56. [Consulta: 2018-01-16].

TOMÁS, F. Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *L. canescens*. *Phytochemistry*, [en línea], vol. 1 (1987), pp. 2281–2284. [Consulta: 2017-12-05]. disponible en [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84701-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84701-9)

TORRES, B. Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology*, [en línea], 1a. ed. (2013) , pp. 12-13. [Consulta: 2017-11-25]. disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>

VERAS, H. Topical Anti inflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham : Possible Mechanism of Action. *Phytotherapy Research*, [en línea] 3a. ed. (2017), Valencia sociedad de España, pp. 500-501. [Consulta: 2018-02-12]. disponible en: <https://doi.org/10.1002/ptr.4695>

XIAO, L. Solar radiation shielding properties of transparent LaB6 filters through experimental and first-principles calculation methods. [en línea] vol. 2 n. 12 (2017), pp. 137-138. [Consulta: 2018-02-12]. disponible en *Ceramics International*, 42(12), 14278–14281. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.05.105>

XUEYAN, X. Expression, purification and characterization of active untagged recombinant human leukemia inhibitory factor from *E.coli*. *Archivo de la sociedad española de Protein Expression and Purification*, [en línea] (2014), pp. 200, 11-13. [Consulta: 2017-12-01]. disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.03.020>

YOON, Y. Inactivation efficiency of plasmid-encoded antibiotic resistance genes during water treatment with chlorine, UV, and UV/H₂O₂. *Water Research*. [en línea] 2a. ed. lima, elseiver peru, 2016 pp. 68-69. [Consulta: 2017-11-04]. disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.056>

ZAMORANO, E. Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion over genetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique. *Archivos de la sociedad de Cartagena ambientalista*. [en línea], vol. 3 n. 1(2014), pp. 152, 85–90. [Consulta: 2018-01-03]. disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.002>

ZENGIN, G. In vitro and in silico insights of *Cupressus sempervirens*, *Artemisia absinthium* and *Lippia triphylla*: Bridging traditional knowledge and scientific validation. *Archivos Europeos del Journal of Integrative Medicine*. [en línea] vol. 2 n. 12(2016), pp. 135–141. [Consulta: 2017-12-05]. disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.05.010>

ANEXOS

Anexo A: Análisis estadístico del efecto fotoprotector frente a radiación UVB.

Tabla 1-A. Resultado del Área bajo la curva de las sustancias fotoprotectoras a concentración de 20 ppm.

BLANCO	OMC 20	PALMIDATO 20	<i>L.triphylla</i> 20
780000000	930000000	855060000	810000000
915000000	915000000	990120000	915000000
73500000	1110000000	735060000	900000000

Tabla 2-A. Resultado del Área bajo la curva de las sustancias fotoprotectoras a concentración de 200 ppm.

BLANCO	OMC 200	PALMIDATO 200	<i>L.triphylla</i> 200
780000000	1110180000	1155480000	960240000
915000000	885120000	1065360000	945240000
73500000	975180000	1035660000	825180000

Tabla 3-A. Resultado del Área bajo la curva de las sustancias fotoprotectoras a concentración de 2000 ppm.

BLANCO	OMC 2000	PALMIDATO 2000	<i>L.triphylla</i> 2000
780000000	1411320000	1441080000	1080600000
915000000	1531440000	1125840000	1005420000
73500000	1261500000	1231140000	1230720000