



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE *Passiflora mixta*”

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MURILLO SANCHEZ JESSICA MERCEDES

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

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Jessica Mercedes Murillo Sanchez

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

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

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE *Passiflora mixta*” de responsabilidad de la señorita egresada Jessica Mercedes Murillo Sanchez, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF Diego Vinueza Tapia M.Sc.
**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Susana Abdo, M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jessica Mercedes Murillo Sanchez, 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, 20 de Abril del 2017

Jessica Mercedes Murillo Sanchez

CI: 172506894-2

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de titulación a mis padres y hermano quienes han sido una guía, un apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

Jessica

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme salud y fuerzas para seguir adelante. A mis queridos padres Teodoro y Flor por su apoyo incondicional. De igual forma mi sincero agradecimiento Al BQF. Diego Vinueza y Dra. Susana Abdo, por brindarme su apoyo, conocimientos, consejos y amistad para realizar el presente trabajo.

Jessica

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC	área bajo la curva
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATCC	American type culture collection
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPS	Factor de protección solar
h	hora
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
OMC	2-etilhexil-4-metoxicinamato
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pamidato-O	octil dimetil PABA
Rf	factor de retención
TLC	Thin layer chromatography
UFC	Unidades formadoras de colonias
uL	microlitro
UV	Ultravioleta
UVA	Radiación ultravioleta A
UVB	Radiación ultravioleta B
UVC	Radiación ultravioleta C
UVI	Índice ultravioleta
W/m²	Intensidad de radiación

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 La radiación ultravioleta	3
1.1.1 Tipos de radiación ultravioleta	4
1.1.2 Factores que influyen en la radiación ultravioleta	4
1.1.3 Efectos biológicos de la radiación UV-A y UV-B	5
1.1.3.1 Cáncer de piel	6
1.2 Fotoprotección	7
1.2.1 Tipos de fotoprotectores	8
1.2.1.1 Filtros físicos	8
1.2.1.2 Filtros químicos	8
1.2.1.3 Antioxidantes	9
1.2.2 Factor de protección solar	10
1.3 Género Passiflora	11
1.3.1 Propiedades farmacológicas	11
1.3.2 Composición fitoquímica	11
1.3.2.1 Flavonoides glicosilados	11

1.4	<i>Passiflora mixta</i>	12
1.4.1	<i>División taxonómica</i>	12
1.4.2	<i>Distribución</i>	13
1.4.3	<i>Descripción</i>	13

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	14
2.1	Lugar de recolección de la muestra	14
2.2	Lugar de investigación	14
2.3	Identificación botánica	14
2.4	Materiales y equipos	14
2.4.1	<i>Material Biológico</i>	14
2.4.2	<i>Equipos</i>	15
2.5	Acondicionamiento del material vegetal	15
2.6	Control de calidad material vegetal	15
2.7	Tamizaje fitoquímico	15
2.8	Elaboración del extracto <i>Passiflora mixta</i>	15
2.9	Cromatografía en capa fina	16
2.10	Cuantificación de metabolitos secundarios	16
2.10.1	<i>Determinación del contenido de Flavonoides Totales</i>	16
2.10.2	<i>Determinación del contenido de Fenoles Totales</i>	17
2.10.3	<i>Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH*</i>	17
2.11	Preparación del estándar McFarland	18
2.12	Determinación del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i>	19
2.13	Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida	20

CAPITULO III

3.1	Control de calidad de hojas de <i>Passiflora mixta</i>	22
3.2	Tamizaje fitoquímico	23
3.3	Cromatografía en capa fina	24

3.4	Cuantificación de metabolitos secundarios	25
3.4.1	<i>Cuantificación de Fenoles Totales</i>	25
3.4.2	<i>Cuantificación de flavonoides Totales</i>	27
3.4.3	<i>Cuantificación de Radicales libres</i>	27
3.5	Control de calidad de estándar McFarland	28
3.6	Factor de Protección solar FPS <i>in vitro</i>	29
3.7	Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida.....	29
	CONCLUSIONES.....	34
	RECOMENDACIONES.....	35
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	La radiación electromagnética según la longitud de onda.....	3
Tabla 2-1:	Tipo de protección según el FPS	10
Tabla 3-1:	Clasificación taxonómica	12
Tabla 4-1:	Principales caracteres cualitativos polimórficos de <i>Passiflora mixta</i>	13
Tabla 1-2:	Descripción de equipos utilizado.....	15
Tabla 1-3:	Resultados del control de calidad de <i>Passiflora mixta</i>	22
Tabla 2-3:	Tamizaje fitoquímico de hojas de <i>P. mixta</i>	23
Tabla 3-3:	Compuestos identificados en hojas <i>P. mixta</i> por TLC	24
Tabla 4-3:	Absorbancia de estándar de ácido gálico.....	25
Tabla 5-3:	Contenido de fenoles totales en extracto de hojas <i>Passiflora mixta</i>	26
Tabla 6-3:	Actividad antioxidante del extracto de <i>Passiflora mixta</i>	27
Tabla 7-3:	Absorbancias de los estándares McFarland.....	28
Tabla 8-3:	Contenido de flavonoides totales en extracto de hojas <i>Passiflora mixta</i>	27
Tabla 9-3:	Factor de protección solar FPS <i>in vitro</i>	29
Tabla 10-3:	Efecto fotoprotector del control positivo OMC.....	29
Tabla 11-3:	Efecto fotoprotector del control positivo Pamidato- O.....	30
Tabla 12-3:	Efecto fotoprotector del extracto de <i>Passiflora mixta</i>	30
Tabla 13-3:	Test Anova de un factor para el índice de fotoprotección	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Principios activos de fotoprotección aprobados por la FDA.....	8
Figura 1-2: Preparación de estándar de Mc Farland.....	18
Figura 2-2: Tabla de los valores de EE X I preestablecidos.....	19

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1-1:	Taxo (<i>Passiflora mixta</i> var. mixta).....	12
Grafico 1-3:	Curva de calibración de ácido gálico.....	26
Grafico 2-3:	Curva de calibración del estándar McFarland.....	28
Grafico 2-3:	Índice de fotoprotección frente a la irradiación UV-B sobre <i>E. coli</i>	31

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Control de calidad de la materia vegetal
- Anexo B:** Tamizaje fitoquímico
- Anexo C:** Exposición a radiación UV-B del extracto de *Passiflora mixta*, Pamidato-O y OMC
- Anexo D:** Colonias de *E. coli* sobrevivientes tras exposición a radiación UV-B, con el extracto de *Passiflora mixta* a 2000 ppm
- Anexo E:** Curva de calibración del estándar de quercetina
- Anexo F:** Curva de calibración del estándar de Ácido gálico, para la cuantificación de antioxidantes
- Anexo G:** Análisis estadístico de la actividad fotoprotectora, mediante muerte celular inducida
- Anexo H:** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra
- Anexo I:** Certificado de identificación de *Passiflora mixta*
- Anexo J:** Análisis estadístico de la actividad fotoprotectora, mediante muerte celular inducida

RESUMEN

Se evaluó la actividad fotoprotectora *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Passiflora mixta* var. *mixta*, mediante el método de muerte celular inducida por radiación UV-B sobre una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. El extracto se preparó usando etanol 70% (v/v) como solvente extractivo, y maceración dinámica durante 72 h en oscuridad; la mezcla fue filtrada al vacío, concentrada bajo condiciones controladas con el objetivo de eliminar el solvente orgánico y finalmente liofilizada. El tamizaje fitoquímico demostró la presencia de metabolitos secundarios como; compuestos fenólicos, flavonoides, taninos de tipo pirocatécolico, alcaloides, compuestos lactónicos, triterpenos, esteroides, azúcares reductores, quinonas y antocianinas. A través de cromatografía en capa fina fueron registrados posibles flavonoides especialmente de tipo C-glycosidos como; vitexina 2-O-ramnósido, isovitexina 2-O-glucósido, quercetina-3-rutinósido y quercetina-3-O-glucósido. El contenido de fenoles totales determinado por el método Folin-Ciocalteu fue de 325 ± 7.07 mg GAE/g de liofilizado; en tanto que el contenido de flavonoides totales fue de 629.04 ± 6.23 mg QE/g liofilizado. La actividad antioxidante evaluada con el radical DPPH* del extracto de *Passiflora mixta* en términos de IC₅₀ se logró a una concentración de extracto liofilizado de 5.43 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) disuelto en metanol. El Factor de protección solar (FPS) del extracto de *P. mixta* calculado a una concentración 20 ppm, luego de aplicar la ecuación de Mansur y el método espectrofotométrico para el registro de absorbancias obtuvo un valor de 7.00 ± 0.08 . El número de unidades formadoras de colonias de *E. coli* sobrevivientes tras su exposición a radiación UV-B, fueron transformados en valores de área bajo la curva. Los resultados indican que los extractos a 2000 ppm y 200 ppm de *P. mixta* tienen mayor actividad fotoprotectora en comparación con los controles positivos octil dimetil PABA y 2-etilhexil 4-metoxicinamato (OMC) a la misma concentración. Se recomienda realizar pruebas que garanticen la seguridad.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA> <CURUBA DE MONTE (*Passiflora mixta* var. *mixta*)>, <FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR>, <RADIACIÓN ULTRAVIOLETA UV-B>, < ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA>, < MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO>, < BACTERIA INTESTINAL (*Escherichia coli*)>.

SUMMARY

The photoprotective activity *in vitro* of the hydroalcoholic extract of *Passiflora mixta* var. *mixta* by UV-B induced cell death method on a strain of *Escherichia coli* ATCC 25922. The extract was prepared using 70% (v/v) ethanol as an extractive solvent and dynamic maceration for 72 h in darkness; the mixture was vacuum filtered, concentrated under controlled conditions in order to remove the organic solvent and finally lyophilized. Phytochemical screening demonstrated the presence of secondary metabolites such as; phenolic compounds, flavonoids, pyrophoretic type tannins, alkaloids, lactone compounds, triterpenes, steroids, reducing sugars, quinones and anthocyanins. Flavonoids, especially of the C-glycosides type, were recorded as thin layer chromatography; vitexin 2-O-rhamnoside, isovitexin 2-O-glucoside, quercetin-3-rutinoside and quercetin-3-O-glucoside. The total phenol content determined by the Folin-Ciocalteu method was 325 ± 7.07 mg GAE/g of lyophilisate; While the total flavonoid content was 629.04 ± 6.23 mg QE / g lyophilized. The antioxidant activity evaluated with the DPPH* radical of the *Passiflora mixta* extract in terms of IC₅₀ was achieved at a lyophilized extract concentration of 5.43 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dissolved in methanol. The sun protection factor (SPF) of the extract of *P. mixta*. calculated at a concentration of 20 ppm, after applying the Mansur equation and the spectrophotometric method for the recording of absorbances obtained a value of 7.00 ± 0.08 . The number of surviving colony forming units of *E. coli* after exposure to UV-B radiation were transformed into area under a curve. The results indicate that the extracts at 2000 ppm and 200 ppm of *P. mixta* have higher photoprotective activity compared to the octyl dimethyl PABA and 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (OMC) positive controls at the same concentration. Testing to ensure safety is recommended.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <WILD CURUBA (*Passiflora mixta*)>, <SUN PROTECTION FACTOR>, < ULTRAVIOLET RADIATION UV-B >, < PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY >, < SPECTROPHOTOMETRIC METHOD >, < INTESTINAL BACTERIA (*Escherichia coli*)>.

INTRODUCCIÓN

La exposición crónica a la radiación ultravioleta genera efectos perjudiciales sobre la piel, debido a la degradación de componentes como el ADN y proteínas, que sumada al daño inducido sobre los ácidos grasos; desembocan en una desestabilización de la membrana y efectos biológicos irreversibles (Chen, Hu and Wang, 2012, p1014). De este modo se originan procesos de inflamación, eritema, pigmentación, inmunosupresión, hiperplasia, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento (Suva, 2014, p.95).

Los efectos pueden variar según el componente del espectro electromagnético de la radiación ultravioleta que se trate, mismo que se divide en UVA (315-480 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm) (Figueiredo *et al.*, 2014, pp.66). La radiación UVB es de 30 a 40 veces más energética con respecto a la radiación UVA. Este componente UVB es la principal causa de patologías en la piel (≈80%) , afectando especialmente las células epidérmicas y produciendo daño biológico (González, 2014, pp. 5-6). Asociada con disfunciones inmunológicas, anomalías en el material genético y desarrollo de Neoplasia (Francislene *et al.*, 2016, p.35).

La intensidad de la radiación UV depende de factores como; latitud, nubosidad, altitud, densidad de la capa de ozono e índice de reflexión del suelo. Es así, que en el Ecuador al igual que para otros territorios localizados cerca de la línea ecuatorial, el índice de radiación ultravioleta supera fácilmente los 19 puntos en magnitud. Un valor superior a lo establecido por la Organización Mundial de la salud (2017), que considera 11 como indicador de radiación extremadamente alto.

El uso de productos de protección solar es la principal medida de protección contra los efectos nocivos de los rayos UV (Silva *et al.*, 2016, p510). Los compuesto fenólicos son componentes naturales que se encuentran en las plantas, los cuales poseen propiedades importantes tanto químicas como biológicas, de entre las que se destaca el elevado poder antioxidante, debido a la capacidad de estas moléculas de reducir la producción de radicales y estabilizar las reacciones inducidas por el oxígeno y sus especies tipo radical (Nichols y Katiyar, 2010, p72). Además, presentan la capacidad para actuar como filtros solares mediante absorción de la radiación UV, y; están en capacidad de reducir la inflamación así como el estrés oxidativo, previniendo de este modo el envejecimiento prematuro y disminuyendo efectos perjudiciales en la piel (Agati *et al.*, 2013, pp.38).

La *Passiflora mixta* conocida comúnmente como taxo del monte, es nativa de América del sur, se desarrolla entre 1.700 y 3700 m.s.n.m. pertenece a la familia de Passifloraceae. De acuerdo a

Zucolotto et al.,(2012, pp. 232-259) en el análisis de especies de *Passiflora*; establece que los flavonoides de tipo C-glucósidos son los principales componentes de estas especies apigenina y luteolina, tales como vitexina, isovitexina y orientina, además de quercetina, kaempferol, catequina y epicatequina. Además contienen alcaloides, ácidos grasos, ácidos fenólicos, cumarinas, fitosteroles y trazas de aceite esencial (Evans, 2009 p.263).

En consecuencia, y por intermedio del presente estudio se busca determinar la actividad fotoprotectora *in vitro* de las hojas de *Passiflora mixta*, mediante muerte celular inducida por radiación UV-B en una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Contribuyendo a mejorar la calidad de vida de la población y al fortaleciendo de la matriz productiva.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 La radiación ultravioleta

Es una forma de radiación óptica de longitudes de onda electromagnéticas más cortas de 100 a 400 nm. Tiene efectos beneficiosos para la salud y desempeña una función esencial en la generación de vitamina D, así como para la esterilización bacteriana. Sin embargo la excesiva exposición a la radiación ultravioleta puede ocasionar daño biológico, con la aparición de tumores no-melanoma, edema, foto-envejecimiento, quemaduras, enfermedades oculares así como la disminución de la eficacia del sistema inmunitario (Organización Mundial de la salud, 2017).

La radiación ultravioleta forma parte del espectro electromagnético en un 7% y también son emitidas por fuentes artificiales empleadas en industria, ciencia y medicina. La radiación ultravioleta se la ha subdividido en diferentes rangos de longitud de onda (ver Tabla 1-1). La radiación UVA- UVB son ondas electromagnéticas que llegan a la superficie de la Tierra. Estas radiaciones tienen diferentes niveles de penetración afectando la piel humana (González, 2014, p.4).

La radiación electromagnética según la longitud de onda

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

Categoría Espectral	Abreviatura	Rango de longitud de onda (nm)
Ultravioleta de vacío	VUV	200 – 10
Ultravioleta extremo	EUV	121 – 10
Línea Lyman-alpha	H Lyman- α / Ly- α	122 – 121
Ultravioleta B (onda media)	UVB	315 – 280
Ultravioleta C (onda corta)	UVC	280 – 100
Ultravioleta cercano (<i>near</i>)	NUV	400 – 300
Ultravioleta medio (<i>middle</i>)	MUV	300 – 200
Ultravioleta lejano (<i>far</i>)	FUV	200 – 122

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

Fuente: (The International Organization for Standardization, 2007)

1.1.1 Tipos de radiación ultravioleta

La luz ultravioleta, se divide en diferentes tipos dependientes de las longitudes de onda: UVA (315-480 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm) (Figueiredo *et al.*, 2014: p.66). La radiación UV-A: Llega en mayor proporción a la superficie de la Tierra en un 95%, debido a que es poco absorbida por el ozono (Carrasco y Idesia, 2009: p.58). Penetran profundamente hasta dermis, aunque son menos intensos provocando una foto-oxidación inmediata, arrugas, riesgo de cáncer de piel, constituye una importante señal fotomorfogénica en las plantas y es la menos dañina que la radiación UV-B (Goldsmith *et al.*, 2012: pp.1031-1039).

La radiación UV-B: Absorbida en mayor proporción por la capa de ozono, consiste en onda corta, mas energética con baja penetración ya que en su mayoría sólo alcanza la capa epidérmica de células basales de la piel, afectando principalmente a las células epidérmicas alterando su proliferación. Es la principal causa de patologías en la piel en un 80% en causar daño biológico como quemaduras, además de ser un agente altamente genotóxico y fotocarcinogénesis por la interrupción de ADN (González, 2014, pp.5-6).

Radiación UV-C: Los rayos UVC son más energéticos y dañinos para el ADN. Sin embargo no llegan a la superficie terrestre, por ser los más absorbidos por el oxígeno (O₂) y el O₃ de la estratosfera (Carrasco y Idesia, 2009: pp.59-76).

1.1.2 Factores que influyen en la radiación ultravioleta

La intensidad radiación ultravioleta depende de múltiples factores que la absorben y la dispersan como: ángulo cenital solar, la hora del día, la época del año, la latitud geográfica mientras más cerca de la línea ecuatorial mayor radiación. Así como altitud, nubosidad, el ozono y la refracción del suelo. A mayor altitud la radiación ultravioleta aumenta en 10 a 12% por cada 1000 metros. Mientras que con presencia de nubosidad disminuye en un 10%. Además que la refracción de la superficie refleja los rayos UV (Organización Mundial de la salud, 2017).

En los últimos años el deterioro de la capa de ozono ha sido intensa por sustancias contaminantes como el bromo, cloro óxidos de nitrógeno y los clorofluorocarbonos formando compuestos estables con una vida promedio de 50 a 150 años (Carrasco y Idesia, 2009: pp.56-59). Es así que desde valores obtenidos en 1998 las concentraciones de ozono han disminuido en latitudes altas como en la Antártida en 40-50% y en la zona ecuatorial en un 3 – 6 % (Rodríguez García, et al, 2001: pp.266-272).

1.1.3 Efectos biológicos de la radiación UV-A y UV-B

Los efectos inducidos por la radiación UV en la piel, depende de la duración de la exposición, distinguiendo entre exposiciones crónicas y agudas. La manifestación más clara de la exposición aguda a la radiación UV es la quemadura solar enrojecimiento o quemadura solar. La radiación UV-B tiene la mayor capacidad de causar quemaduras solares en la piel humana (González, 2014, pp. 4-5).

Otro signo típico de exposición aguda a la radiación UV es la pigmentación oscura de la piel. Esto puede ser debido al aumento de la producción de melanina por los meloncitos o la foto-oxidación de la melanina. Es así que la exposición a la radiación UV también produce efectos favorables, ayuda a la acción de ciertos neurotransmisores en el cerebro responsable de estado de ánimo, sentimientos de bienestar. Además, es un precursor de la conversión de 7-dehidrocolesterol necesario para la formación de vitamina D3. Fuentes artificiales como lámpara de UV son utilizadas para tratar procesos que causan excesiva proliferación de la piel, como la psoriasis y dermatitis seborreica (González, 2014, pp.4-5).

La exposición aguda a la radiación UV-B aumenta la capacidad de fotoprotección en la piel. Estimula la producción de melanina, produciendo un oscurecimiento y engrosamiento del estrato córneo, lo que significa, a su vez, una mayor protección contra ataques posteriores causados por la radiación (Epstein y Wang, 2015).

La exposición crónica a la radiación ultravioleta puede estimular algunas lesiones cutáneas que varían del grado de pigmentación basal del individuo. Las pecas y manchas en la piel, causadas por la distribución inadecuada de pigmentos, arrugas y actínicos Queratosis (lesión precancerosa) son consecuencias directas de la exposición Luz UV (González, 2014, pp.4-5). Se produce un daño especialmente los queratinocitos de la epidermis para causar disqueratosis, cuando la capa de queratina se espesa y se deshidrata, se produce la pérdida de su elasticidad, dando una aspecto áspero generando la presencia de arrugas (Kim y Moon, 2015: pp.168-165).

Además, la exposición excesiva al sol puede Envejecimiento prematuro causado por la destrucción de las fibras de elastina y colágeno de la dermis. Sin embargo, la radiación UV es la principal causa de cánceres de piel, incluyendo carcinoma de células basales (BCC), carcinoma de células escamosas (SCC) y el melanoma. Ya que puede causar dímeros de pirimidina en las células epidérmicas, desencadenando una serie de mutaciones en los genes. La luz UV puede producir inmunosupresión efectos que pueden promover la persistencia de algunos tumores de

piel. Se debería notar que la incidencia de cáncer de piel es mayor en los trópicos, en los caucásicos y las personas con STP I las más propensas (González, 2014, p.5).

La exposición excesiva a la radiación UV solar puede dar lugar a efectos tanto agudos como crónicos, afectando a los ojos produciendo fotoqueratitis (inflamación de la córnea y el iris) y fotoconjuntivitis (inflamación de la conjuntiva). Además de efectos crónicos como cataratas, cáncer de conjuntiva (Gilaberte y González, 2010: p.660). La radiación UV-A y UV-B genera efectos negativos alterando el sistema inmunológico debido a la disminución de células dérmicas de Langerhans, produciendo alergias solares como la lucitis estival benigna provocada e por la radiación UV-A. Cuando la exposición es desencadena reacciones fotosensibilizantes y fototóxica (Ferreira Cestari et al, 2012: p.140).

1.1.3.1 Cáncer de piel

La radiación UV excesiva produce mutaciones genéticas que conlleva producir a cáncer de piel, siendo tipo más frecuente de canceres en el ser humano, con una alta incidencia. Es así que el 99% corresponde a tumores de piel no-melanoma, carcinoma basocelular (CBC) y espinocelular (CEC); el melanoma maligno representa un porcentaje muy pequeño, pero el más agresivo responsable de un alto nivel de mortalidad (Ferreira, T. 2012, p.136).

El cáncer de piel no melanoma es el tipo más común de cáncer, así como el carcinoma de baso celular seguido de espinocelular. Por la exposición excesiva a la radiación solar, y predisposición común en las personas fototipo de piel I o II, se manifiesta a partir de las células epidérmicas pluripotenciales de la capa basal y menos frecuentemente de los anexos cutáneos. Es que no se propaga con rapidez ya que es invasivo localmente, sin embargo las metástasis son excepcionales, ya que pueden afectar hasta los huesos. El carcinoma espinocelular es poco común, se origina a partir de los queratinocitos o sus anexos epidérmicos. Son más propensas las personas inmunodeprimidas con VIH, así como queratosis actínica en 5% (Guyer, 2003, p.58).

El melanoma maligno es el menos común, causante de la muerte de 75% de los canceres de piel, incidencia está aumentando de forma dramática entre las personas de piel blanca de todo el mundo Siendo altamente invasivo produciendo neoplasia. La causas por predisposición genética, la exposición muy frecuente a la radiación solar u otro tipo de radiaciones. Se origina a partir de los melanocitos diseminados de las capas basales de la epidermis, desde los vasos sanguíneos a los ganglios linfáticos regionales por consiguiente a la vía sanguínea. Por lo que es necesario el control a tiempo de esta patología (Cabrera and López, 2006: pp.26-27).

1.2 Fotoprotección

Fotoprotección es un conjunto de medidas adoptadas para limitar y prevenir los efectos de la radiación UV, desempeña un papel fundamental para evitar los efectos no deseados de la luz del sol (Megna *et al.*, 2017: pp.28-33). Siendo una estrategia preventiva y terapéutica fundamental frente al fotoenvejecimiento y el cáncer de piel (Hupel *et al.*, 2011: pp.362-371).

Además existen otras barreras contra la radiación ultravioleta, de origen natural, agentes biológicos (cromóforos epidérmicas), agentes físicos fotoprotectores (ropa, sombreros, maquillajes, gafas de sol, y la ventana de cristal). Y agentes que pueden modular los efectos de la luz ultravioleta sobre la piel (antioxidantes y otros) (Kullavanijaya y Lim, 2005: pp.937-958).

Los fotoprotectores o filtros solares contienen moléculas o complejos moleculares que pueden absorber, reflejar o dispersar fotones de radiación UV. Para prevenir los efectos de la radiación como el eritema y la quemadura solar es necesaria una protección frente a la radiación UVB-UVA, es decir fotones altamente energéticos. Un fotoprotector eficaz es aquel que puede prevenir, mejorar incluso reparar los daños cutáneos producidos por la radiación solar. Además deben ser seguros para el ser humano y el ambiente (Gilaberte y González, 2010: pp.659-672).

Sus efectos protectores incluyen

- Absorción directa de fotones
- Inhibición de la inflamación crónica
- Modulación de la inmunosupresión
- Inducción de apoptosis
- Actividad antioxidante directa
- Antioxidante indirecta. (Gilaberte y González, 2010: pp.659-672)

Los fotoprotectores tradicionales son ampliamente utilizados y ejercen una fotoprotección pasiva, la cual no es eficaz una vez que el daño en las células se ha generado después de la exposición solar. Por el contrario, la fotoprotección activa se encuentra en los protectores solares tópicos, incluyendo antioxidantes y enzimas de reparación del ADN, tales como fotoliasa, T4 endonucleasa V y 8 oxoguanine glicosilasa, son capaces de mejorar el poder protector de los protectores solares tradicionales (Megna *et al.*, 2017: pp.28-33)

1.2.1. Tipos de fotoprotectores

1.2.1.1 Filtros físicos

Los filtros físicos o inorgánicos son aquellos reflejan y dispersan la radiación ultravioleta. Últimas tendencia se ha desarrollado de microfina o nanopartículas reduciendo así la piel blanquecina, potenciando con filtros químicos para aumentar el SPF en un 50–70%. Entre los más significativos encontramos a los óxidos metálicos como: el dióxido de titanio TiO_2 y óxido de zinc (ZnO)(Duro et al., 2003, p.162).

1.2.1.2 Filtros químicos

Son sustancias orgánicas que absorben los fotones de la radiación UVA y UVB alterando su estructura molecular. Se los pueden clasificar por espectro de absorción óptimo en filtro UVA-UVB. (Duro Mota, Campillos Páez and Causín Serrano, 2003) Recientes investigaciones se adoptado por microcápsulas de glass sol-gel, mejorando la fotoestabilidad, reduciendo la penetración del filtro UV, por ende, su potencial alérgico. Así como nuevas combinaciones con agentes antioxidantes como el nitróxido de piperidina y el OMC los cuales además de absorber la radiación, reduce la peroxidación lipídica (Gilaberte y González, 2010: pp.659-672).

FDA-approved*active sunscreen ingredient	Maximum FDA-approved concentration (%)	Peak absorption wavelength (nm)	Range of protection (nm)	Protection provided (UVB/UVA)
Inorganic				
Titanium dioxide	25.0	Varies	290-350	UVB, UVA2
Zinc oxide	25.0	Varies	290-400	UVB, UVA1
Organic UVB				
PABA	15.0	283	260-313	
Padimate O	8.0	311	290-315	
Octinoxate (octyl methoxycinnamates)	7.5	311	280-310	
Cinoxate	3.0	290	270-328	
Octisalate (octyl salicylate)	5.0	307	260-310	UVB
Homosalate	15.0	306	290-315	
Trolamine salicylate	12.0	260-355	269-320	
Octyloxyethylene	10.0	303	287-323	
Ensulizole (phenylbenzimidazole sulfonic acid)	4.0	310	290-340	
Organic UVA				
Oxybenzone	6.0	290, 325	270-350	UVB, UVA2
Sulisobenzene	10.0	366	250-380	UVB, UVA2
Dioxybenzone	3.0	352	206-380	UVB, UVA2
Meradimate (menthyl anthranilate)	5.0	336	200-380	UVA2
Avobenzone	3.0	360	310-400	UVA1, UVA2
Ecamsule (terephthalidene dicamphor sulfonic acid [Mexoryl SX])	10.0	345	295-390	UVA1, UVA2

Figura 1-1: Principios activos de fotoprotección aprobados por la FDA

Fuente: (Gilaberte y González, 2010: pp.659-672).

1.2.1.3 Antioxidantes

Son sustancias con eficiencia fotoprotectora ya que estimulan la reparación de procesos oxidativos, daños en ADN, como peroxidación lipídica, alteración de proteínas estructurales generadas por la radiación UVA la cual es 10 veces mayor que la radiación UVB. El espectro de acción de los antioxidantes se superpone con el espectro de acción de la radiación UVA (320–400 nm). Por cuanto no se puede comparar su eficacia antioxidantes en relación al factor de protección solar FPS el cual es mínimo, debido a que no previene la aparición de eritema, por su limitada capacidad de bloqueo de los rayos UVB (Gálvez, 2010, pp.197-200).

Cabe agregar este hecho no descarta como fotoprotector, ya que protegen a la piel daño cutáneo fotoinducido, procesos intermedios celulares y moleculares lesivos y donde los fotoprotectores tópicos con FPS muy elevado no pueden actuar (Gálvez, 2010, pp.197-200).

Antioxidantes tópicos se encuentran en los flavonoides, resveratrol, y extractos de té verde, puede disminuir el daño de la piel producido por la exposición a la radiación UVA (Sambandan y Ratner, 2011: p.749).

- Carotenoides son pigmentos inorgánicos antioxidantes luteína y la astaxantina actúan sobre los radicales peroxilipídicos, inhibiendo el acumulo de poliaminas libres inducidas por la radiación UVA (Gilaberte y González, 2010: pp. 659-672).
- Polifenoles sustancias químicas con efecto fotoprotector se encuentran en las plantas, poseen un grupo fenol por molécula. Son subdivididos en taninos hidrolizables y fenilpropanoides en donde se encuentran los flavonoides, entre (Gilaberte y González, 2010: pp. 659-672).
- Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos con propiedades antioxidantes. Poseen e grupo hidroxilo fenólicos en su estructura química, tienen propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, desempeñando protección frente a los fenómenos de daño oxidativo (Gilaberte y González, 2010: pp. 659-672).

Están presentes órganos externos de superficie tales como tricomas, en la pared y la vacuola de las células epidérmicas. La regulación de la síntesis de los B_ flavonoides de anillo sustituido con dihidroxi (como la luteolina 7-O- y la quercetina 3- O -glucósidos) depende la alta radiación de la solar. Mientras que no afecta la biosíntesis de monohidroxi B-sustituidos en el anillo flavonoides (como la apigenina 7- O - y kaempferol 3- O -glucósidos). Los flavonoles derivados

de quercetina sensibles UV-B, tienen coeficientes de extinción molar (ϵ) máximos a alrededor de 350 nm y ϵ mínimos a aprox. 300 nm (Agati *et al.*, 2013: pp.35-45).

1.2.2 Factor de protección solar

Es una medida de la eficacia de la protección solar SPF, que se basa en un ensayo *in vivo* que mide la protección contra eritema inducido principalmente por la radiación (UVB; 290-320 nm) y (UVA; 320-340 nm) (Wang *et al.*, 2017: pp. 362-366).

Un SPF15 bloquea el 94% de la radiación UVB, mientras que SPF30 bloquea alrededor del 97%. SPF se define como el MED (Dosis eritemática mínima), proporción entre piel protegida y desprotegida. El estándar FDA para pruebas SPF requiere aplicación de 2 mg / cm² a la piel protegida (Sambandan y Ratner, 2011: pp.748-758).

$$FPS = \frac{\text{MED zona de protección}}{\text{MED zona de no protección}}$$

El factor de protección solar (FPS) depende de la composición de filtro UV, y la cantidad y tipo de vehículo del protector solar aplicado (Sohn *et al.*, 2016: p-77). El FPS varía según el tipo de piel. Es así que persona piel más clara se broncean con facilidad por lo que es ideal utilizar FPS 50.

Desde 1997 de acuerdo con el estándar del COLIPA (Cosmetics Europe Personal Care Association) permite una clasificación según el nivel de foto protección.

Tabla 2-1: Tipo de protección según el FPS

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

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

Fuente: (Sambandan y Ratner, 2011: p.748).

Factor de protección (UVA-PF), es la relación de dosis mínima de pigmentación (MPD) a la piel desprotegida. Son medidores de protección UVA2 (340-400 nm).Es la capacidad de prevenir el bronceado. Dosis mínima de pigmentación es la cantidad de UVA requerida que produce el primer oscurecimiento observable del pigmento (Sambandan y Ratner, 2011: pp.748-758).

1.3 Género *Passiflora*

Passiflora es el género más importante de la familia Passifloraceae, abarca alrededor de 450 especies distribuidas en América del Sur (Bravo *et al.*, 2017: p.80), en regiones templadas y tropicales a 3000 m sobre el nivel del mar (m.s.n.m.); pero la mayor diversidad de este género se encuentra en las regiones cálidas y templadas, entre 400 y 2000 m.s.n.m (Marín *et al.*, 2009: p.118).

1.3.1 *Propiedades farmacológicas*

Algunas especies del género *Passiflora* se emplean con fines medicinales para el tratamiento de insomnio, la inquietud y la irritabilidad (Evans, 2009 p.57). Las hojas de *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. alata*, *Passiflora incarnata* y *P. edulis* se aceptan como sedantes e hipnóticos en preparaciones fitofarmacéuticas y el fruto de *P. edulis* var. *flavicarpa* y *P. lingularis* presenta propiedades antidiabéticas, antimicrobianas y antioxidantes. Los frutos de *Passiflora tarminiana* reducen el fotoenvejecimiento (Bravo *et al.*, 2017: p.80).

1.3.2 *Composición fitoquímica*

Los principales componentes del género de *Passiflora*, son los flavoides C-glucósidos de Apigenina y luteolina tales como vitexina, isovitexina, orientina, iso-orientina y sus 2-β-d-glucósidos (Evans, 2009 p.269). Además de quercetina, kaempferol, catequina y epicatequina (Bravo *et al.*, 2017: p.80) y vestigios de glucósidos cianogénicos (ginocardina), aceites volátiles, antocianinas, trazas de alcaloides indólicos como harmano, harmol y harmina. (Evans, 2009 p.269).

1.3.2.1 *Flavonoides glicosilados*

Los flavonoides son el grupo más representativo de los compuestos fenoles naturales. Se forman a partir de tres unidades de acetato y una unidad de fenilpropano. Se encuentran en estado libre o en forma de glucósidos. La mayor parte de glucósidos en estado libre son O-glucósidos pero existe también un número considerable de flavonoides C-glucósidos. Los glucósidos son solubles en agua y alcohol e insolubles disolventes orgánicos (Evans, 2009 p.263). Responsables de propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

1.4 *Passiflora mixta*



Grafico 1-1: Taxo (*Passiflora mixta* var. *mixta*)
Fuente: (UniProt Consortium, 2014)

1.4.1 División taxonómica

Tabla 3-1: Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
División:	Tracheophyta
Subdivisión:	Spermatophytina
Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden:	Rosanae Takht.
Orden:	Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia:	Passifloraceae Juss. ex Roussel.
Género:	<i>Passiflora</i> L.
Especie:	<i>mixta</i> L.f.
Nombre común: taxo de monte	

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017
Fuente: (Pérez A., 2017)

1.4.2 Distribución

Passiflora mixta también denominada curuba de indio, taxo del monte o tumbo. Planta silvestre, nativa de los Andes que se desarrolla entre 1.700 m y 3.700 m.s.n.m, se extiende desde Venezuela hasta Bolivia (Asturizaga et al, 2006: p.336).

1.4.3 Descripción

Son plantas trepadoras que pueden alcanzar 1-2 m de longitud. Presenta tallos angulosos pubescentes o glabros, con hojas trilobadas y coriáceas, sus pedúnculos son más rígidos de 5 a 7 cm. de largo, que mantienen generalmente a las flores en posición parcialmente erecta. Los frutos elipsoide, fusiforme de coloración verde-amarillento (Primot et al., 2005: p.469).

Tabla 4-1: Principales caracteres cualitativos polimórficos de *Passiflora mixta*

Órgano	Descripción
Tallo	
Forma exterior	Estriado/angulado
Pubescencia	Glabro aterciopelado
Estípulas	
Duración	Deciduas
Pecíolo	
Pubescencia	Poco densa/terciopelado
Hoja	
Pubescencia envés	Glabro/aterciopelado
Pubescencia haz	Glabro a aterciopelado
Bráctea	
Pubescencia	Glabro a aterciopelado
Flor	
Forma de la copa	Campanulada
Orientación	Semi-erecta (10-50°)
Color ovario	Amarillo verdoso/kaki
Color estilos	Rosado
Distribución de color estilos	Uniforme/moteado
Fruto	
Forma	Elipsoide/fusiforme
Color	Amarillo verde
Manchas de Antracnosis	Algunas medias

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

Fuente: (Primot et al., 2005: p.469)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de recolección de la muestra

La recolección del material vegetal se realizó mediante muestreo aleatorio simple de aproximadamente 200g de hojas de *Passiflora mixta*, en la parroquia “La Candelaria” del cantón Penipe de la provincia de Chimborazo cuyas coordenadas (X: 774465.2762797514; Y: 9826673.853821278), altitud: 2670 msnm.

2.2 Lugar de investigación

El trabajo de investigación que se realizó es de tipo experimental y se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.3 Identificación botánica

El espécimen estudiado corresponde a *Passiflora mixta* var. *mixta*; la cual fue identificada por el Ing. Álvaro J. Pérez responsable del Herbario de Pontificie Universidad Católica del Ecuador.

2.4 Materiales y equipos

2.4.1 Material Biológico

Se utilizó cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, adquiridas en el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.4.2 Equipos

Tabla T 1-2: Descripción de equipos utilizados

EQUIPOS	DESCRIPCIÓN
Molino	De cuchillas marca Arthur H, Tomas. C.O. Phila, PA. USA
Sonificador	Marca Branson 2510
Estufa	Marca Mermmet
Rotavapor	BUCHI rotavapor R110& B-465 Water Bath
Mufla	IVYMEN N-8 LITROS 1100°C
Balanza analítica	Balanza electrónica marca RADWAG, de 220g de capacidad x 0,1 mg de lectura mínima.
Cámara UV	Chromato vue modelo cc20
Espectrofotómetro	Cole Parmer S 2150

Realizado por: MURILLO, Jessica, 2017

2.5 Acondicionamiento del material vegetal

Para el desarrollo de la investigación se utilizó como material vegetal hojas de *Pasiflora mixta* de color verde, exento de proceso decoloración y desecación. Posteriormente se realizó el secado en un ambiente oscuro y baja humedad.

Molienda: molino 100W; tamiz 14, para reducir el tamaño de partícula.

2.6 Control de calidad material vegetal

Se determinó por el método gravimétrico descrito en USP 30 (2007 p.261) el contenido de humedad, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido y solubles en agua.

2.7 Tamizaje fitoquímico

Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cuellar y Miranda (2001, pp.38-45), mediante extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente, para identificación cualitativa de metabolitos secundarios.

2.8 Elaboración del extracto *Passiflora mixta*

Para elaborar el extracto se realizó 5 maceraciones por separado en una relación 1:5; Se utilizó 10 g de planta seca y 50 ml de etanol al 70%, mediante maceración por 24 horas a temperatura ambiente protegido de la luz, seguido de 45 min de sonicación. Posteriormente se filtró, para

concentrar la porción líquida del macerado, mediante un rotavapor (marca Büchi R 110) a temperatura de 60°C, hasta sequedad del alcohol. Se filtró y se congeló a una temperatura 0-8°C por 24h. Finalmente se procedió a liofilización por 24 h, con nitrógeno líquido (micromodulyo-115) para obtener el extracto liofilizado.

2.9 Cromatografía en capa fina

Se determinó mediante el método descrito por Wagner y Bladt (1996, p.230), para identificar metabolitos secundarios principalmente flavonoides C-glucósidos presentes en el extracto de *Passiflora mixta* a 2000 ppm, se utilizó placas de Sílica Gel 60 F254 (Merck) como fase estacionario y fase móvil un sistema de solventes: Acetato de etilo: Ácido acético: Acido fórmico: Agua en proporción (10: 1.1: 1.1: 2.6) ml, como revelador se empleó cloruro de aluminio al 1% en metanol y potenciador de fluorescencia el PEG 400 a 5% en metanol. Posteriormente se visualizó en lámpara de luz fluorescente UV-A 365 nm para e determinar la distancia recorrida por cada compuesto.

2.10 Cuantificación de metabolitos secundarios

2.10.1 Determinación del contenido de Flavonoides Totales.

Se determinó el contenido de flavonoides presentes en el extracto de *Passiflora mixta* a 2000 ppm, mediante espectrofotometría, basado en el estudio de Gomes et al. (2017, pp. 28-35) con leves modificaciones.

- a) A una alícuota (100 µL) de extracto de *Passiflora mixta*, se mezcló con 4 mL de agua destilada.
- b) A la solución obtenida, se añadió 300 µL de Nitrito de Sodio al 5 %, se homogenizó en el vórtex y se dejó en reposo por 5 min.
- c) Se agregó 300 µL de Cloruro de Aluminio al 10 %, se homogenizo y dejo en reposo por 6 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- d) Posteriormente se añade 2 ml de Hidróxido de sodio al 1 M, se mezcló y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- e) Finalmente se procedió a registrar la absorbancia a 510 nm frente a la absorbancia del blanco.

El contenido de flavonoides totales de los extractos se expresó como mg de equivalentes de quercetina por gramo (mg QE/g), a través de la curva de calibración de quercetina, a concentraciones de 20, 40 60 y 80 ppm, en metanol al 98%. (Chávez, 2016, pp. 49-50)

2.10.2 Determinación del contenido de Fenoles Totales.

El contenido fenólico total presente en el extracto de *Passiflora mixta*, se determinó mediante un método modificado y adaptado de Folin-Ciocalteu.

- a) A una alícuota (2 ml) del extracto etanólico de *Passiflora mixta* a 2000 ppm, se agregó 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se vortericizó por 1 min y se dejó en reposo 5 min.
- b) Se agregó 500 μL de solución de carbonato de sodio al 20 % y 3 ml de agua destilada, agitando por 1 min e incubando a temperatura ambiente por 1h.
- c) Posteriormente se centrifugo la muestra por 5 min, y procedió a medir la absorbancia de la mezcla a 750 nm en un espectrofotómetro UV / Vis.

Se utilizó ácido gálico como patrón de referencia y el contenido fenólico total se calculó usando la curva de calibración para ácido gálico, a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Los resultados son expresada en mg de equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mg GA / g de muestra). Todas las muestras se analizaron por triplicado. Gomes et al. (2017, pp. 28-35)

2.10.3 Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH*

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó utilizando el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), descrito por Sreejayan y Rao (1996, p.169) con modificaciones menores. Este método se basa en la reducción de DPPH en presencia de un antioxidante (AH), un donante de protones (H^+) para un no radical (DPPH-H).

El estándar o patrón se realizó con ácido gálico a concentraciones de 10-20-40-60-80 y 100 ppm, la solución de DPPH* se obtuvo a partir de la mezcla de 5,9 mg del radical DPPH* + 250mL de metanol al 98%.

- Se tomó 100 μL de la muestra (extracto etanólico de *Passiflora mixta* 200 ppm) o de la solución estándar, con 3,9 ml de la solución de DPPH, se agito la mezcla con la ayuda de un vórtex.
- Incubar por 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Transcurrido el tiempo establecido se midió la absorbancia a una λ de 515nm

Se expresó los resultados como concentración inhibitoria media ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y porcentaje de Actividad Captadora de Radicales Libres

La inhibición del radical DPPH se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 * \frac{A_o - A_s}{A_o}$$

A_o = Absorbancia del control negativo

A_s = Absorbancia de la muestra

El valor de concentración del extracto que puede inhibir el 50% de los radicales DPPH (IC_{50}), se calculó a partir de la ecuación del gráfico de dispersión lineal. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado (Caneschi, 2016, pp. 34-39).

2.11 Preparación del estándar McFarland

El estándar McFarland se utiliza para estandarizar la concentración de la suspensión bacteriana. La densidad de la suspensión se ajusta aproximadamente 10^8 UFC por mililitro comparando con la turbidez de estándar McFarland N°0.5. Se prepara agregando 0.5 ml de 0.048 M de $BaCl_2$ (1.175% p/v de $BaCl_2 * H_2O$) y 9.95 ml de H_2SO_4 0.36 N. Se debe controlar la densidad del estándar mediante espectrofotometría. La absorbancia a 625 nm debe ser de 0.08-0.1 (Koneman et al., 2006, p.932).

Cat No.	McFarland Standard	1% $BaCl_2$ (mL)	1% H_2SO_4 (mL)	Approximate Bacterial Suspension / mL
TM50	0.5	0.05	9.95	1.5×10^8
TM51	1.0	0.10	9.90	3.0×10^8
TM52	2.0	0.20	9.80	6.0×10^8
TM53	3.0	0.3	9.7	9.0×10^8
TM54	4.0	0.4	9.6	1.2×10^9
TM55	5.0	0.5	9.5	1.5×10^9
TM56	6.0	0.6	9.4	1.8×10^9
TM57	7.0	0.7	9.3	2.1×10^9
TM58	8.0	0.8	9.2	2.4×10^9
TM59	9.0	0.9	9.1	2.7×10^9
TM60	10.0	1.0	9.0	3.0×10^9

Figura 1-2: Preparación de estándar de Mc Farland
Fuente (DALYNN BIOLOGICALS, 2014)

Para el control de calidad del estándar McFarland, que corresponde a la suspensión, el valor de su absorbancia, se reemplazó en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración realizada con el McFarland Nº 1, 2, 3,4 (DALYNN BIOLOGICALS, 2014).

2.12 Determinación del factor de protección solar (FPS) *in vitro*

El SPF se determinó por el método descrito por Mansur et al. (1986, pp.121-124). Se realizó un análisis espectrofotométrico al extracto liofilizado de *Passiflora mixta*, y los controles positivos (OMC Y Pamidato-O), a una concentración de 20 ppm, registrando la absorbancia a 290-320 nm en intervalos de 5 nm, usando un espectrofotómetro. UV Cole Parmer S-21590 y celdas de cuarzo de 1 cm (Dal Prá et al., 2017, pp.363).

El cálculo del SPF se determinó de acuerdo con la ecuación:

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

Donde:

EE (λ): Representa el espectro del efecto eritematogénico,

I (λ): Representa la intensidad del espectro solar

Abs (λ): Representa la absorbancia del producto con protección solar

CF: es el factor de corrección igual a 10

Los valores de la relación entre el efecto eritematogénico, y la intensidad de la radiación para cada longitud de onda EE (λ) \times I (λ) son constantes como se indica a continuación.

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

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

Figura 2-2: Tabla de los valores de EE X I preestablecidos

Fuente (Mansur et al., 1986, p. 123)

2.13 Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida

La determinación de la actividad fotoprotectora *in vitro* de las hojas de *Passiflora mixta* se realizó, mediante muerte celular inducida por radiación UV-B, en una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

- Se reactivó las cepas *E. coli* ATCC 25922 en caldo de infusión cerebro corazón medio líquido adecuado para el enriquecimiento y siembra en agar Muller Hinton para su reactivación a 37°C.
- Se preparó una solución de 2000, 200 y 20 ppm del extracto liofilizado de *P. mixta*, Pamidato-O y OMC en etanol al 70%.
- Las suspensiones bacterianas de *E.coli*, se diluyeron en 5 mL de solución salina Cloruro de sodio al 0,9% (p/v) en tubos de cuarzo de 1 cm de diámetro, se comparó con el grado de turbidez del estándar McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL), visualizando los dos tubos contra un fondo blanco con líneas negras.
- Los tubos que contenían la suspensión bacteriana se coloca detrás de la sustancia con posible actividad fotoprotectora extracto de *P. mixta*, de los controles positivos Pamidato-O y OMC a diferentes concentraciones, ambas columnas formaron unidades experimentales.
- Unidades experimentales fueron irradiadas con una lámpara de UVB marca Philips Broadband TL 40 w/12 RS a una dosis de radiación de 0.60 J/cm².
- Se determinó el número de UFC sobrevivientes a la radiación UVB sembrando aproximadamente 5µL de la suspensión bacteriana en agar Muller; previa homogenización por 1 min en vórtex, cada 30 minutos durante 3 horas.
- En el tiempo 0 y 1 las bacterias fueron sembradas luego de realizar diluciones con solución salina al 0.9% (1: 20000 y 1:5000).

El ensayo se realizó tres veces por triplicado a cada uno de los extracto con diferentes concentraciones y de la misma manera a los controles positivos Octilmetoxicinamato (OMC) Y Pamidato O a las misma concentraciones propuestas anteriormente disolviéndolos con etanol al 70 %. El blanco utilizado fue el etanol al 70% (Ávila et al.,2005: pp.301-309).

2.11 Análisis estadístico de datos

Las unidades formadoras de colonias de *E. coli* sobrevivientes de la exposición a radiación UV-B, fueron transformados en valores de área bajo la curva del extracto de *Passiflora mixta* y de los controles positivos Pamidato-O y OMC a diferente concentración.

Se aplicó la prueba de Kolmogorov Smirnov, para verificar la normalidad de los datos. Posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor y la prueba de Tukey, mediante el programa estadístico IBM SPSS STATISTICS 21 para la valoración de la actividad fotoprotectora.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de hojas de *Passiflora mixta*

Previa la utilización de la droga cruda es necesario realizar un control de calidad de las hojas de *Passiflora mixta*, para garantizar condiciones óptimas para la investigación. De acuerdo a la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos, y Real Farmacopea Española 2002, los parámetros analizados como Humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido se encuentran dentro valores de referencia. (Tabla 3-1)

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

PARÁMETROS	HOJAS (<i>Passiflora mixta</i>)	ESPECIFICACIONES (NEPT)	FARMACOPEA ESPAÑOLA 2002
Contenido de humedad (%)	9,30 ± 0,022	8 – 14 %	14%
Contenido de cenizas totales (%)	4.60 ± 0,030	Hasta 12 %	5%
Contenido de cenizas solubles en agua (%)	1,30 ± 0,034	Hasta 7 %	2%
Contenido de cenizas insolubles en ácido Clorhídrico	0.31 ± 0,041	Hasta 5 %	1%

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

El contenido de humedad mediante el método gravimétrico de *Passiflora mixta* fue de 9.30 %, lo que indica un adecuado tratamiento en el proceso de secado. De acuerdo con Bich *et al.*, (2009, pp. 5-6) en el estudio de metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata*, el porcentaje de humedad fue menor a 14%. Por ende se evita el crecimiento microbiano y micótico afecta la estabilidad, así como la pérdida de metabolitos secundarios por hidrólisis. (Suárez *et al.*, 2012, pp 254-255)

Los resultados obtenidos de cenizas totales fue de 4.60% y 0.31% de cenizas solubles en ácido en *Pasiflora mixta*, valores similares a *Passiflora incarta* según con Bich *et al.*, (2009, pp. 5-6) que fue de 4.45% de cenizas totales y 0.18% de cenizas insolubles en ácido. Lo que indica una menor cantidad de sustancias inorgánicas y de sílice, favoreciendo la pureza de la droga. (Suárez *et al.*, 2012, pp 254-255)

Con respecto a cenizas solubles en agua, *Pasiflora mixta* presenta 1.30% y *Passiflora incarnata* menor a 2%, por lo que se refiere que a la cantidad de sales solubles en la materia vegetal (Suárez *et al.*, 2012, pp 254-255), se encuentran dentro del límite de la Real Farmacopea Española 2002.

3.2 Tamizaje fitoquímico

Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de hojas de *P. mixta*

ENSAYO	METABOLITO		EXTRACTO		
			ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
Sudan	Grasas		-	N/A	N/A
Dragendorff	Alcaloides		-	++	-
Wagner	Alcaloides		-	++	-
Mayer	Alcaloides		-	++	-
Baljet	Lactona cumarina	y	++	++	N/A
Liebermann– Burchard	Triterpenos Esteroides	y	+++	+++	N/A
Catequinas	Catequinas		N/A	-	N/A
Resinas	Resinas		N/A	++	N/A
Fehling	Azúcares reductores		N/A	+++	+
Espuma	Saponinas		N/A	-	++
FeCl₃	Compuestos fenólicos		N/A	+++	++
Borntträger	Quinonas		N/A	+++	N/A
Shinoda	Flavonoides		N/A	+++	++
Antocianidina	Antocianidina		N/A	+++	N/A
Mucilagos	Mucílago		N/A	-	-
Principios amargos			N/A	N/A	+

+++ (Abundante); ++ (Moderado); + (escaso), - (ausencia), N/A (No aplica)

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

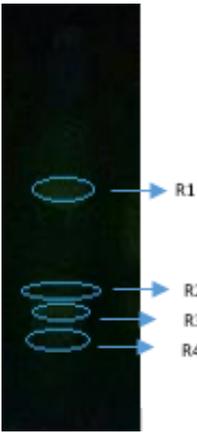
En el tamizaje fitoquímico de *Passiflora mixta*, se identificó la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, taninos de tipo pirocatólicos, flavonoides, alcaloides, compuestos lactónicos, triterpenos o esteroides, azúcares reductores, quinonas y antocianidinas, mediante ensayos cualitativos. No existen informes bibliográficos de investigaciones fitoquímicas de *P. mixta*, por cuanto se compara con fuentes bibliográficas del género de *Passiflora*.

De acuerdo con Carvajal *et al.*, (2014, pp 9-10) el análisis fitoquímico de las cuatro especies de *Passiflora* (*P. quadrangularis*), (*P. maliformis*), (*P. edulis Sims*) y (*P. edulis var flavicarpa*), se evidenció la presencia de compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides y flavonoides. Lo cuales se correlacionan con los resultados de la marcha fitoquímica de *Passiflora mixta*. Los metabolitos secundarios de *Pasiflora edulis* identificados Rojas y Tomás, (2010, pp. 26-27) coinciden con los

resultados obtenidos destacando un alto contenido de flavonoides. A su vez la presencia de alcaloides depende de la especie es así que en *Passiflora edulis* es escasa, a diferencia de *P. mixta* en la que es moderada. En tanto que concentración de flavonoides en *P. quadrangularis* es escaso a diferencia de *P. mixta* que es abundante al igual que *P. edulis*. Cabe recalcar que los compuestos fenólicos en las cuatro especies antes mencionadas es abundante, dato que se correlaciona con *P. mixta*.

3.3 Cromatografía en capa fina

Tabla 3-3: Compuestos identificados en hojas *P. mixta* por TLC

Material Vegetal (<i>Passiflora mixta</i>)			Referencias bibliográficas (Wagner, 2001)	
Hojas	Compuesto	Rf	Compuesto	Rf
	1	0.55	Quercetina-3-O-glucorónico	0.55
	2	0.41	Quercetina-3-rutinósido	0.40
	3	0.37	Vitexina 2-o-ramnósido	0.37
	4	0.20	Isovitexina 2-o-glucósido	0.20

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

De acuerdo con Warner se identificó los posibles flavonoides C-glucósidos como quercetina-3-o-glucorónico, quercetina-3-rutinósido, vitexina 2-o-ramnósido e isovitexina 2-o-glucósido en el extracto liofilizado de *Passiflora mixta*.

Según Wosch et al., (2017, pp) en un estudio cromatografía en capa fina de Pasifloras utilizando un sistema eluyente similar al de Wagner , la presencia de isovitexina es notable en *P. actinia*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. edulis* var flavicarpa, *P. incarnata*, *P. morifolia*, *P. urnifolia* y *P. cocinea*. En cuanto que la presencia de vitexina se destaca en *P. incarnata*, *P. edulis* y *P. morifolia*. Además según el estudio de Müller et al., (2005. pp.349-353), destaca la presencia de isovitexina en *P. incarnata* (1,198 %).

En cuanto a quercetina-3-O-glucorónico se encuentra en *P. alata* en mayor cantidad en las hojas recolectadas en verano que en invierno según Müller *et al.*, (2005, pp.349-353). Esto se debe a que hojas expuestas a mayor radiación, los flavonoides se acumulan en la epidermis superior e inferior así como en el tejido, a diferencia que a menor radiación los flavonoides se encuentran en las células epidérmicas.

Aunque algunas especies de *Passiflora* se emplean para los mismos fines. Las hojas de *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. alata* y *P. edulis* se aceptan como sedantes e hipnóticos en preparaciones fitofarmacéuticas. Su composición química es heterogénea, por ende difieren en la eficacia terapéutica (Wohlmuth *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Zucolotto *et al.*, 2012). Es así que en el estudio de Flavonoides C-glucósidos de Passifloras de América Sur, por HPLC-DAD y HPLC-MS, se identificó la presencia de orientina, isorientina, vitexina e isovitexina, en *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. alata*, *P. tripartita* var. *mollissima* y *P. manicata*. A su vez la vitexin-2''-Orhamnoside se identificó *P. quadrangularis*, *P. alata* y *P. manicata*. (Zucolotto *et al.*, 2012)

3.4 Cuantificación de metabolitos secundarios

3.4.1 Cuantificación de Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales en el extracto de *Passiflora mixta*, se realizó mediante espectrofotometría, interpolando su absorbancia en la ecuación de la recta $y=0.0006x + 0.061$; con un coeficiente de correlación $R_2=0.982$ del estándar de ácido gálico. (Figura 1-3.).

Tabla 4-3: Absorbancia de estándar de ácido gálico

Concentración	Absorbancia
20	0,203
40	0,21
60	0,226
80	0,233
100	0,242

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

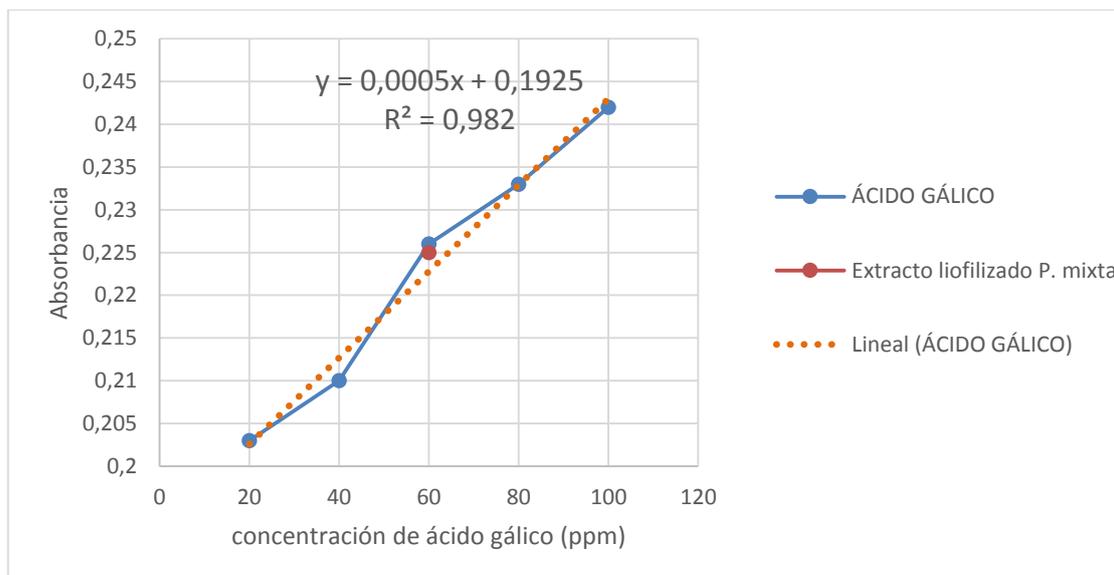


Gráfico 1-3: Curva de calibración de ácido gálico

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

Tabla 5-3: Contenido de fenoles totales en extracto de hojas *Passiflora mixta*

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (mg ácido gálico/ g de extracto liofilizado)
Extracto etanólico 70% de hojas <i>Passiflora mixta</i>	325 ± 7.07mg GA/g

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

La concentración de compuestos fenólicos fue 325 mg GA/g de liofilizado *P. mixta*, se asemeja en estudios realizados por Gomes et al. (2017, pp. 28-35) en la extracción de compuestos fenólicos en el extracto etanólico al 70% de *Passiflora alata*, presentando un contenido de fenoles de 408.33 mg GA/g, mediante extracción acelerada de solventes a 60 °C por el método de Folin-Ciocalteu.

Los compuestos fenólicos poseen propiedades bioactivas tales como protección UV, hidratación de la piel, la restauración de la función barrera y la promoción de la síntesis de colágeno (Mercurio et al., 2015, p. 121). De acuerdo a Zucolotto *et al.*, (2012, pp. 232-259) la presencia de compuestos fenólicos (lucenin-2, vicenin-2, isoorientina, isovitexina, luteolina) en *Passifloras*, poseen actividad antioxidante frente a las especies reactivas de radicales y propiedades de antienvjecimiento (Bravo et al., 2017, pp. 78-88)

3.4.2 Cuantificación de flavonoides Totales

La cuantificación de flavonoides se realizó, mediante espectrofotometría e interpolación de la absorbancia en la curva de calibración de estándar de quercetina (Anexo E), que presentó una ecuación de $y = 0.001x + 0.0015$ y coeficiente de correlación de $R^2 = 0.999$.

Tabla 6-3: Contenido de flavonoides totales en extracto de hojas *Passiflora mixta*

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (mg Equivalente de quercetina/ g de extracto liofilizado)	CONCENTRACIÓN (g Equivalente de quercetina / g de <i>P. mixta</i>)
Extracto etanólico 70% de hojas <i>Passiflora mixta</i>	629.04 ± 6.23 mg QE/g liofilizado	38.75 ± 2.81 mg QE/g <i>P. mixta</i>

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

El contenido total de flavonoides en el extracto liofilizado de hojas de *Passiflora mixta* fue de 38.75mg QE/g *P mixta*; según estudios realizados por Gomes et al. (2017, pp. 28-35) el contenido de flavonoides totales del extracto etanólico al 70% de hojas de *P. alata* fue de 60.89 mg QE / g muestra, mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio. De acuerdo Chabariberi et al., (2009, pp. 860-864) en la determinación espectrométrica de los flavonoides totales en hojas de *P. alata* es de 26, 78 mg rutina/ g muestra y en *P. edulis* 56.16 mg rutina/ g muestra. Mediante el método descrito en la Farmacopea Europea, utilizando rutina como sustancia de referencia, por ser un flavonol diglicosilado (deriva quercetina), cuya estructura química similar a glicósidos flavonoides presentes en las especies estudiada.

3.4.3 Cuantificación de Radicales libres

La capacidad captadora de radicales libres se realizó, mediante espectrofotometría. El valor de concentración del extracto que puede inhibir el 50% de los radicales DPPH* IC₅₀, se obtuvieron por interpolación a partir de la ecuación del gráfico de dispersión lineal (Anexo F), que presentó una ecuación de $y = 0,001x + 0,0015$ y coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9817$

Tabla 7-3: Actividad antioxidante del extracto de *Passiflora mixta*

EXTRACTO	Actividad antioxidante IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) ± SD	Actividad antioxidante según los valores de IC ₅₀
Extracto etanólico 70% de hojas <i>Passiflora mixta</i>	5.43 ± 0.86 (µg mL ⁻¹)	Óptimo (IC ₅₀ < 15 µg mL ⁻¹), Bueno (15 µg mL ⁻¹ < IC ₅₀ < 50 µg mL ⁻¹), Promedio (50 µg mL ⁻¹ < IC ₅₀ < 100 µg mL ⁻¹), Débil (IC ₅₀ ≥ 100 µg mL ⁻¹).

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

La actividad antioxidante del extracto de *Passiflora mixta* fue óptimo de 5.43 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) con respecto a la concentración de inhibición al 50% de DPPH* (IC_{50}). El potencial antioxidante se atribuyó a la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides y taninos, que son capaces de interrumpir las reacciones en cadena causadas por los radicales libres debido a su capacidad de donación de átomos de hidrógeno (Francislene, 2016, pp. 34-39).

3.5 Control de calidad de estándar McFarland

El estándar McFarland, mediante espectrometría interpolando la absorbancia 0.082 en la ecuación recta $y = 0,2068x - 0,037$ obteniendo un resultado de 0.5 McFarland. De acuerdo con Koneman et al., (2006, p. 932) la absorbancia a 625 nm debe ser de 0.8-1.0 para el estándar McFarland. Esta turbidez proporciona una densidad óptica comparable con la suspensión bacteriana de $1 \text{ a } 2 \cdot 10^8$ UFC/ml (Forbes et al., 2009, p. 189).

Tabla 8-3: Absorbancias de los estándares McFarland

Nº estándar McFarland	Absorbancia (625nm)
1	0,169
2	0,389
3	0,561
4	0,801
X= 0,5	0,082

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

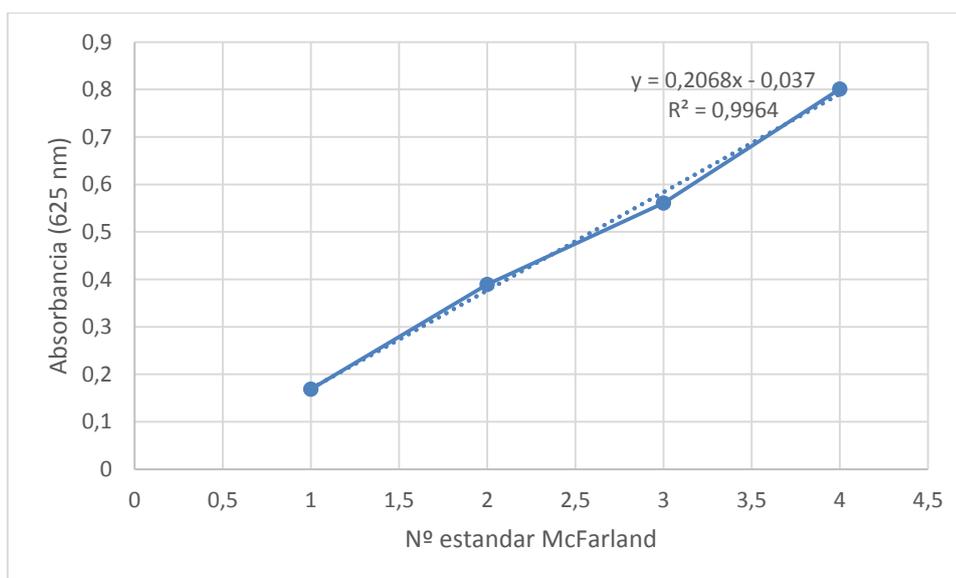


Gráfico 2-3: Curva de calibración del estándar McFarland

Realizado por. MURILLO, Jessica, 2017

3.6 Factor de Protección solar FPS *in vitro*

Se determinó el FPS *in vitro* del extracto etanólico y de los controles positivos OMC y pamidato-O a concentración de 20 ppm, mediante el método descrito por Mansur, el cual posee buena correlación con las pruebas *in vivo*, relacionando la absorbancia con efecto eritematoso generado por la intensidad de la radiación a longitudes de onda de 290 320nm (Silva *et al.*, 2016, p.513).

Tabla 9-3: Factor de protección solar FPS *in vitro*

Sustancia fotoprotectora (20ppm)	FPS <i>in vitro</i>
Extracto etanólico 70% de <i>Passiflora mixta</i>	7.00 ± 0.08
Pamidato-O	14.58± 0.04
Octilmetoxicinamato (OMC)	16.8± 0.12

Realizado por: MURILLO, Jessica, 2017

En la tabla 9-3 muestra el FPS de las sustancias patrón, es superior en el Octilmetilcinamato con valor promedio de 16.8± 0.12 y en el pamidato-O 14.58± 0.04. Si bien un protector solar ideal contiene FPS 15 es adecuado para la protección de acuerdo con los estándares internacionales (Food and Drug Administration, 2012), el extracto de *Passiflora mixta*, puede ser considerado como un ingrediente activo prometedor, ya que presenta un factor de protección de 7.00 ± 0.08 en una baja concentración.

3.7 Efecto de protección solar por el método de muerte celular inducida

Tabla 10-3: Efecto fotoprotector del control positivo OMC

TIEMPO (min)	BLANCO UFC/mL	20ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	2000 ppm UFC/mL
0	76000000 (±14422205,1)	84000000 (±5431390,25)	80888888,9 (±9752492,56)	88888888,9 (±17524585,9)
30	0	1188888,89 (±284800,125)	2433333,33 (±403112,89)	5177777,78 (±556277,31)
60	0	2688,89 (±679,05)	3555,56 (±487,62)	5355,56 (±343,19)
90	0	0	2155,56 (±240,370)	3111,11 (±266,67)
120	0	0	0	1000 (±282,84)
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por. MURRILLO, Jessica, 2017

Tabla 11-3: Efecto fotoprotector del control positivo Pamidato- O

TIEMPO (min)	BLANCO UFC/mL	20ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	2000 ppm UFC/mL
0	76000000 (±14422205,1)	84222222,2 (±8273115,76)	87555555,6 (±11215069,2)	90666666,7 (±12961481,4)
30	0	588888,89 (±176383,42)	2044444,44 (±328295,26)	4311111,11 (±257120,81)
60	0	844,44 (±240,37)	3933,33 (±400)	4822,22 (±737,86)
90	0	0	711,11 (±226,08)	1511,11 (±247,21)
120	0	0	0	355,56 (±218,58)
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0

Realizado por. MURIILLO, Jessica, 2017

Tabla 12-3: Efecto fotoprotector del extracto de *Passiflora mixta*

TIEMPO (min)	BLANCO UFC/mL	20ppm UFC/mL	200 ppm UFC/mL	2000 ppm UFC/mL
0	76000000 (±14422205,1)	96444444,4 (±7055336,8)	94222222,2 (±10790942,7)	96444444,4 4 (±881917 1,1)
30	0	4111111,1 (±1452966,3)	9111111,1 (±1054092,6)	16333333,3 3 (±180277 5,6)
60	0	377,8 (±156,3)	2777,8 (±352,8)	6555,6 (±312,7)
90	0	222,2 (±210,8)	1311,1 (±375,6)	3488,9 (±557,8)
120	0	0	622,2 (±253,9)	1822,2 (±253,9)
150	0	0	0	866,7 (±346,4)
180	0	0	0	0

Realizado por. MURIILLO, Jessica, 2017

Tabla 13-3: Test Anova de un factor para el índice de fotoprotección

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4807928166782400 500,000	9	5342142407536000 60,000	20,587	,000
Intra-grupos	2075935195280000 000,000	80	2594918994100000 0,000		
Total	6883863362062400 500,000	89			

Realizado por: MURILLO, Jessica, 2017

Planteamiento de la hipótesis:

Ho: No existen diferencias en fotoprotectores (Pamidato-O, OMC y *Passiflora mixta*) en índice de fotoprotección $p \geq 0,05$

H1: Existen diferencias en fotoprotectores (Pamidato-O, OMC y *Passiflora mixta*) en índice de fotoprotección $p \leq 0,05$

Decisión:

Existen argumentos para desechar Ho: porque el nivel de significación es menor a 0.05 (0. 0), por tanto existen diferencias en fotoprotectores (Pamidato -O, OMC y *Passiflora mixta*) respecto al índice de fotoprotección

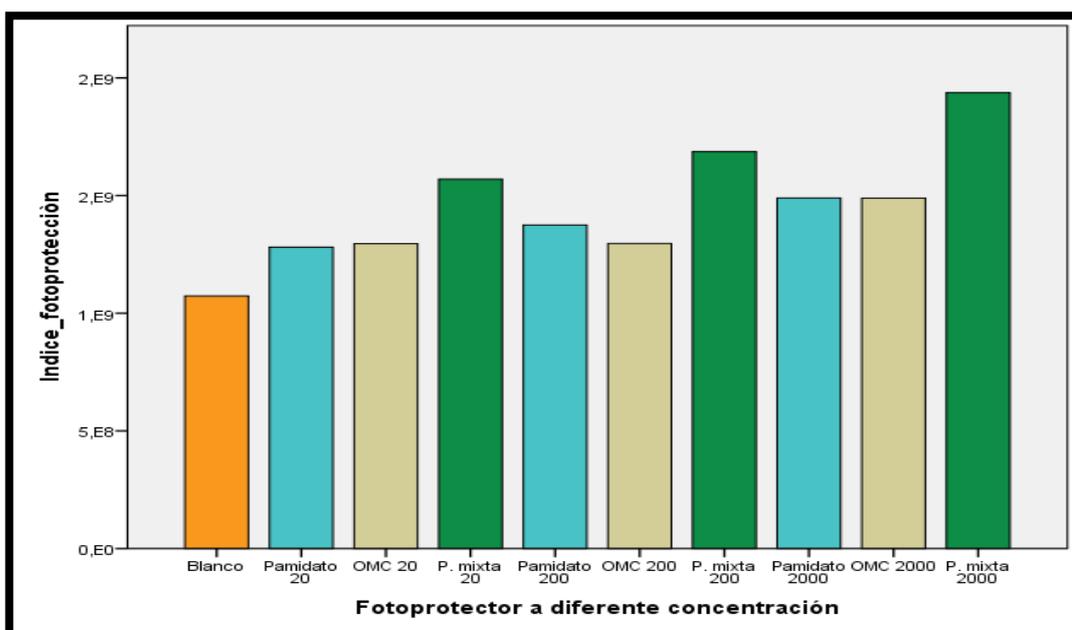


Gráfico 3-3: Índice de fotoprotección frente a la irradiación UV-B sobre *E. coli*

Realizado por: MURILLO, Jessica, 2017

El índice protección solar se calculó, a partir del número de unidades formadoras de colonias de *E. coli* sobrevivientes tras exposición a radiación UV-B fueron transformados en valores de área bajo la curva del extracto de *Passiflora mixta* y de los controles positivos Pamidato-O y OMC a diferente concentración. El índice de fotoprotección indica la magnitud de la sobrevivencia de cepas de *E. coli*. Por consiguiente un mayor valor ABC, indica superior sobrevivencia bacteriana tras la exposición a la radiación UV-B.

Mediante el análisis de varianza ANOVA se estableció que el extracto de *Passiflora mixta* 2000 ppm tiene mayor actividad fotoprotectora que los controles Pamidato-O y OMC a la misma concentración. A su vez no existe una diferencia estadísticamente significativa entre Pamidato-O 20ppm, OMC 20 ppm y OMC 200 ppm puesto que sus valores de ABC son cercanos, presentando menor actividad fotoprotectora (Anexo G). Además se puede evidenciar (tabla 12-3) que el control negativo el blanco (etanol al 70%), no presentó protección alguna frente a la radiación UV-B, por lo que su índice de protección es bajo.

El extracto de *Passiflora mixta* 2000, 200 y 20 presenta mayor protección a las bacterias *E. coli* que los controles positivos de Pamidato-O y OMC a la misma concentración como lo indica en la (Gráfico 3-3). Por ende se evidencia que el extracto liofilizado de *P. mixta* tiene buena actividad fotoprotectora *in vitro* frente a principios activos de fotoprotección comerciales.

De acuerdo Ávila *et al.*, (2005 pp.301-309); En el estudio de Actividad fotoprotectora se evidencio que el extracto metanólico de *Buddleja scordioide* presenta un tiempo de fotoprotección de 37-65 min en estudio de muerte celular inducida por radiación UV-B en una cepa de *E. coli*. En el estudio de GARCÍA BORES *et al.*,(2010 pp.100-108) Actividad fotoprotectora de los polifenoles de *Yucca periculosa* y de las sustancias aisladas del extracto: el trans-3,3',5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (MS), el resveratrol y la naringenina. El extracto metanólico y resveratrol y el control positivo OMC protegieron sus respectivas poblaciones de bacterias por 60 min. La MS protegió la bacteria más eficientemente que el control positivo por 90 min.

En el estudio de García-Bores *et al.*, (2017: pp.72-81) *Lippia graveolens* efecto foto quimiopreventivo contra UVB carcinogénesis de piel inducida por radiación, el tiempo de supervivencia de *E. coli* del extracto metanólico 2000 ppm de *Lippia graveolens* fue de 150 min. Valor similar por el extracto etanólico 2000 ppm de *Passiflora mixta* que proporciona tiempo de fotoprotección entre 150 min.

La actividad fotoprotectora del extracto hidroalcohólico de *Passiflora mixta* a 2000 ppm se atribuye a la posible presencia de compuestos fenólicos especialmente los C glicósidos. Los

flavonoides como las flavonas y los flavonoles no están restringidos a las flores, también están presentes en hojas de todas las plantas verdes, protegiendo a las células del exceso de radiación UV-B, debido a que se acumulan en capas epidérmicas de hojas y tallos, absorbiendo la luz intensamente. Además la exposición de las plantas a la radiación UV-B, aumenta la síntesis de flavonas y flavonoles (Nichols y Katiyar, 2010, p72).

Los compuestos fenólicos presenta un elevado poder antioxidante, debido a la capacidad de estas moléculas de reducir la producción de radicales y estabilizar las reacciones inducidas por el oxígeno y sus especies tipo radical (Nichols y Katiyar, 2010, p72). Además, presentan la capacidad para actuar como filtros solares mediante absorción de la radiación UV, reduciendo la inflamación así como el estrés oxidativo, previniendo de este modo el envejecimiento prematuro y disminuyendo efectos perjudiciales en la piel (Agati *et al.*, 2013, pp.38).

CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Passiflora mixta* presenta actividad fotoprotectora *in vitro* superior a los controles positivos Pamidato-O y OMC a la misma concentración, mediante muerte celular inducida por la radiación UV-B en cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Presentando un tiempo máximo de supervivencia de 150 min a concentración de 2000 ppm del extracto etanólico de *P. mixta*.
- En perfil fitoquímico de las hojas de *Passiflora mixta*, se identificó mediante ensayos cualitativos la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos taninos de tipo pirocatécolicos, flavonoides, alcaloides, compuestos lactónicos, triterpenos o esteroides, azúcares reductores, quinonas y antocianidinas. A través del proceso cromatográfico la probable presencia de flavonoides C-glicósidos como Quercetina-3-O-glucorónico, Quercetina-3-rutinósido, Vitexina 2-o-ramnósido y Isovitexina 2-o-glucósido en el extracto liofilizado de *Passiflora mixta*.
- El factor de Protección solar del extracto de *Passiflora mixta*, puede ser considerado como un ingrediente activo prometedor, ya que presenta un factor de protección de 7.00 ± 0.08 en una baja concentración de 20 ppm.

RECOMENDACIONES

- La recolección del material vegetal se debe realizar, cuando los niveles de radiación sean altos, debido a que las plantas presentan mayor cantidad de flavonoides.
- Considerar los puntos críticos en el ensayo de fotoprotección por muerte celular inducida con *Escherichia coli*, como el tiempo de agitación, el nivel de radiación, así como la cantidad inicial de UFC para evitar posibles errores en el análisis el mismo que malogre un resultado.
- Se debe complementar el estudio con pruebas que garanticen la seguridad como: fototoxicidad; absorción percutánea; corrosividad cutánea; mutagenicidad y genotoxicidad. Para ser usados en filtros solares naturales más efectivos, seguros y accesibles para la población en general

BIBLIOGRAFÍA

- AGATI, G.; et al.** 'Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past'. *Plant Physiology and Biochemistry* [en línea], 2013, (Italia) 72(1), pp. 35-45. Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 1090-7807. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>
- ASTURIZAGA, A.; ØLLGAARD, B. & BALSLEV, H.** 'Frutos comestibles'. *Botanica Economica de los Andes Centrales* [en línea], 2016, (Bolivia) 29(1), pp. 329-346. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 1589-0460. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602012000100009
- ÁVILA, J.; CASTAÑEDA, C. & BENÍTEZ, F.** 'Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*'. *Fitoterapia* [en línea], 2005, (México) 76(3), pp. 301-309. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 0250-5460. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.009>
- BRAVO, K.; et al.** '*Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts'. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2017, (Colombia) 168(1), pp. 301-309. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 10111344. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.01.023>
- CABRERA MORALES, C.; LÓPEZ NEVOT, M.** 'Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel'. *Oncología* [en línea], 2006, (España) 29(7), pp. 291-298. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 0378-4835. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352006000700003
- CARRASCO, R.** 'Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas'. *Idesia* [en línea], 2006, (Chile) 27(3), pp. 59-76. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 0718-3429. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>
- CARVAJAL, L.; et al.** 'Propiedades funcionales y nutricionales de seis especies de *Passiflora* (Passifloraceae) del departamento del Huila, Colombia'. *Caldasia* [en línea], 2014, (Colombia) 36(1), pp. 1-15. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 2357-3759. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/caldasia.v36n1.21243>

CHABARIBERI, R.; et al. ‘Spectrometric determination of flavonoids from Maytenus (Celastraceae) and Passiflora (Passifloraceae) leaves and comparison with an HPLC-UV method’. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2009, (Brasil) 19(4), pp. 860–864. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 0102-695X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600011>

CHÁVEZ PILCO, Belén Estefanía. Evaluación de las actividades antiinflamatoria “in vivo” y antioxidante de tinturas elaboradas a base de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y SANGRE DE DRAGO (*Croton lechleri*) (Tesis pregrado). [En línea] Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 2016. pp. 1-97. [Consulta: 02 enero 2017]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5727/1/56T00656.pdf>

CHEN, L.; HU, J. & AND WANG, S. ‘The role of antioxidants in photoprotection: A critical review’. *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2012, (EE.UU) 67(5), pp. 1013-1024. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 10976787. Disponible en: [http://www.jaad.org/article/S0190-9622\(12\)00131-4/abstract](http://www.jaad.org/article/S0190-9622(12)00131-4/abstract)

CUELLAR, A.; & MIRANDA, H. ‘Farmacognosia y productos naturales’. La Habana- Cuba: Varela, F, 2001, pp. 32–45.

DAL PRÁ, V.; et al. ‘Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from palm pressed fiber with high antioxidant and photoprotective activities’. *Ultrasonics Sonochemistry* [en línea], 2017, (Brasil) 36(1), pp. 362-366. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 13504177. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417716304606>

DALYNN BIOLOGICALS. *McFarland standard* [en línea]. Calgary-Canadá: 2014. [Consulta: 02 enero 2017]. Disponible en: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf

DURO MOTA, E.; CAMPILLOS PÁEZ, M. T. & CAUSÍN SERRANO, S. ‘El sol y los filtros solares’. *Medifam* [en línea], 2003, (España) 13(3), pp. 159-165. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 11315768. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682003000300005

EPSTEIN, J. H.; WANG, S. P. *UVA&UVB* [en línea]. New York: 2015. [Consulta: 02 enero 2017]. Disponible en: <http://www.skincancer.org/prevention/uva-and-uvb>.

EVANS, W. C. *Trease y Evans Pharmacognosy*. 16^a ed. Edinburgh- Escocia: Saunders Elsevier, 2009. pp. 1-614.

FERREIRA CESTARI, T.; OLIVEIRA, F. & CATUCCI BOZA, J. ‘Considerations on photoprotection and skin disorders’. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* [en línea], 2012, (Brasil) 139(4), pp. S135–S143. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 01519638. Disponible en: [http://doi.org/10.1016/S0151-9638\(12\)70125-4](http://doi.org/10.1016/S0151-9638(12)70125-4)

FIGUEIREDO, S.; et al. ‘*In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract’. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2014, (Brasil) 131(1), pp. 65-73 [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 10111344. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414000050>

FORBES, B.; et al. *Diagnóstico Microbiológico* [en línea]. 16^a ed. Buenos Aires -Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2008. p. 189. [Consulta: 02 enero 2017]. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=jyVQueKro88C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Diagn%C3%B3stico+Microbi%C3%B3logico%E2%80%99&ots=50OeZ35RgC&sig=IR9rbToNCww4RtEOeSgVM0ZhXbs#v=onepage&q=Diagn%C3%B3stico%20Microbi%C3%B3logico%E2%80%99&f=false>.

FRANCISLENE, M.; et al. ‘Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts’. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2016, (Brasil) 161(1), pp. 34-39. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 1011-1344. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416303554>

GÁLVEZ, M. ‘Antioxidants in photoprotection: Do they really work?’. *Actas Dermosifiliog* [en línea], 2010, (España) 101(3), pp. 197-200. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 00017310. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398594>

GARCÍA BORES, A.; et al. ‘Photoprotective activity of *Yucca periculosa* Polyphenols’. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* [en línea], 2010, (México) 9(2), pp. 100–108. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 0717 7917. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/856/85612475005/>

- GARCÍA-BORES, A.; et al.** 'Lippia graveolens photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis'. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2017, (México) 167(a), pp. 72-81. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 10111344. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416308922>
- GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S.** 'Novedades en fotoprotección'. *Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2010, (España) 101(8), pp. 659-672. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 00017310. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/novedades-fotoprotección/articulo-resumen/S0001731010002760/>
- GOLDSMITH, L.; et al.** *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 8^{va} ed. New York-USA: The McGraw-Hill Companies, 2012. pp. 1031-1039.
- GOMES, S.; et al.** 'Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in Passiflora species'. *Microchemical Journal* [en línea], 2017, (Brasil) 132(1), pp. 28-35. [Consulta: 02 enero 2017]. ISSN 0026265X. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X16304441>
- GONZÁLEZ, Z. L.** *Percutaneous Absorption of UV Filters Contained in Sunscreen Cosmetic Products: development of analytical methods*. Valencia-Espana: Springer Theses, 2014. pp. 3-20.
- HUPEL, M.; POUPART, N. & AR GALL, E.** 'Development of a new *in vitro* method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation'. *Talanta* [en línea], 2011, (Francia) 86, pp. 362-364. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 00399140. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011008344>.
- KIM, S.; MOON, G.** 'Photoprotective Effect of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) Seed Tea against UVB Irradiation'. *Preventive nutrition and food Science* [en línea], 2015, (Korea) 20(3), pp. 162-168. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 2287-8602. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4596341/#>
- KONEMAN, E.; et al.** *Diagnóstico Microbiológico*. 6^a ed. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana SA, 2006. pp. 932-933

- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W.** ‘Photoprotection’. *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2005, (EE.UU) 52(6), pp. 937–958. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 0190-9622. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019096220422674>
- LI, H.; et al.** ‘Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* “edulis” and *Passiflora edulis* “flavicarpa”’. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2011, (China) 133(3), pp. 1085-1090. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 03788741. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411000824X>
- MANSUR, J.; et al.** ‘Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria’. *An. Bras. Dermatol*, v. 61, n.3, (1986), (Brasil) pp. 121–124.
- MARÍN, M.; CAETANO, C. & POSADA, C.** ‘Caracterización morfológica del género *Passiflora*’. *Acta agronómica* [en línea], 2009, (Colombia) 58(3), pp. 117-125. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 0120-2812. Disponible en:
http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/11499/0
- MEGNA, M.; et al.** “Active” photoprotection: sunscreens with DNA repair enzymes.’ *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. [en línea], 2017, (Italia) 152(3), pp. 302-307. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 1827-1820. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209050>
- MERCURIO, D. G.; et al.** ‘*In vivo* photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, Ginkgo biloba and red algae extracts’. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biolog* [en línea], 2015, (Brasil) 153(1), pp. 121-126. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 18732682. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.016>
- MÜLLER, S.; et al.** ‘LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves’. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 2005, (Brasil) 37(2), pp. 399-403. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 07317085. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708504005643>
- NICHOLS, J.; KATIYAR, S. K.** ‘Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms’. *Archives of Dermatological*

Research [en línea], 2010, (EE.UU) 302(2), pp. 71-83. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 03403696. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00403-009-1001-3>

NORMAS ECUTORIANAS. Fitoterápico Droga Cruda Especificaciones Generales, 1999. Quito-Ecuador. pp.6-12

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Radiación ultravioleta* [en línea]. Ginebra, 2017. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 07317085. Disponible en: http://www.who.int/topics/ultraviolet_radiation/es/.

PRIMOT, S.; et al. ‘Variación morfológica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el Valle del Cauca (Colombia)’. *Revista Brasileira de Fruticultura* [en línea], 2005, (Colombia) 27(3), pp. 467-471. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 0100-2945. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452005000300030>

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA 2ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y consumo. (2002).pp. 671

RODRÍGUEZ GARCÍA, R.; HECHAVARRÍA MIYARES, J. & AZZE PAVÓN, M. ‘Cáncer de piel y ocupación’. *Revista Cubana de Medicina* [en línea], 2001, (Cuba) 40(4), pp. 266–272. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 1561-302X. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232001000400005

ROJAS, A. J.; TOMÁS, C. G. ‘Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante *in vitro* de *passiflora edulis* sims (maracuyá)’. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* [en línea], 2010, (Perú) 13(1), pp. 23-29. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 1609-7599. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4544>

SAMBANDAN, D.; RATNER, D. ‘Sunscreens: An overview and update’. *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2011, (EE.UU) 64(4), pp. 748-758 [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 01909622. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2010.01.005>

SILVA, R. V.; et al. ‘*In vitro* photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation’. *Industrial Crops and*

Products [en línea], 2016, (Brasil) 83(1), pp. 509-514. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 09266690. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.077>

SOHN, M.; et al. ‘Calculation of the sun protection factor of sunscreens with different vehicles using measured film thickness distribution -Comparison with the SPF *in vitro*’. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2016, (Suiza) 159(1), pp. 74-81 [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 18732682. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.038>

SREEJAYAN; RAO, M. ‘Free radical scavenging activity of curcuminoids.’. *Arzneimittelforschung* [en línea], 1996, (EE.UU) 46(2), pp. 71-169. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 8720307. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720307>

SUÁREZ, H.; et al. ‘Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*’. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [en línea], 2012, (Cuba) 17(3), pp. 268-278. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 10284796. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/Vol_17_2_12/pla07312.htm

SUVA, M. ‘Evaluation of Sun Protection Factor of *Zingiber officinale* Roscoe Extract by Ultraviolet Spectroscopy Method’. *Journal of PharmaSciTech* [en línea], 2014, (India) 3(2), pp. 21-23. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 2321 4376. Disponible en: http://www.pharmascitech.in/admin/php/uploads/65_pdf.pdf

ISO 21348 THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
(2007). *Definitions of Solar Irradiance Spectral Categories*

‘**USP 30 FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**’ (2007), p. 261.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Thin Layer Chromatography Atlas. Second edi, Understanding the World Economy.* 2^a ed. Berlín – Alemania: Springer, 1996.p.230

WANG, S.; et al. (2017) ‘Comparison of ultraviolet A light protection standards in the United States and European Union through *in vitro* measurements of commercially available sunscreens’, *Journal of the American Academy of Dermatology* [en línea], 2017, (New York) 136(1), pp. 1-6. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 01909622. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019096221730035X>

WOHLMUTH, H.; et al. 'Pharmacognosy and chemotypes of passionflower (*Passiflora incarnata* L.)'. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* [en línea], 2010, (Australia) 33(6), pp. 1015-1018. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 1347-5215. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/44648986_Pharmacognosy_and_Chemotypes_of_Passionflower_Passiflora_incarnata_L

WOSCH, L.; et al. 'Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile'. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [en línea], 2017, (Brasil) 27(1), pp. 40-49. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 0102695X. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X16301995>

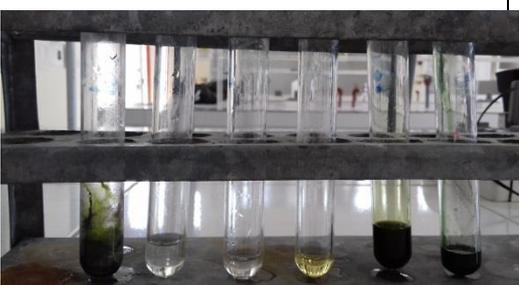
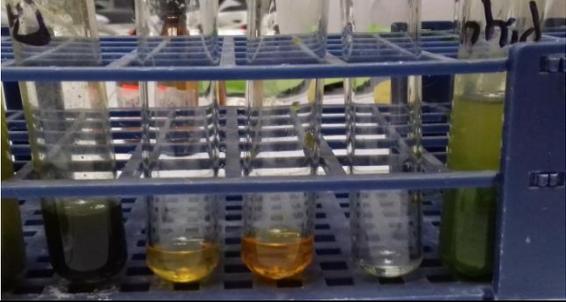
ZUCOLOTTO, S.; et al. 'Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS'. *Phytochemical Analysis* [en línea], 2012, (Brasil) 23(3), pp. 232-239. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 09580344. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858882>

ANEXOS

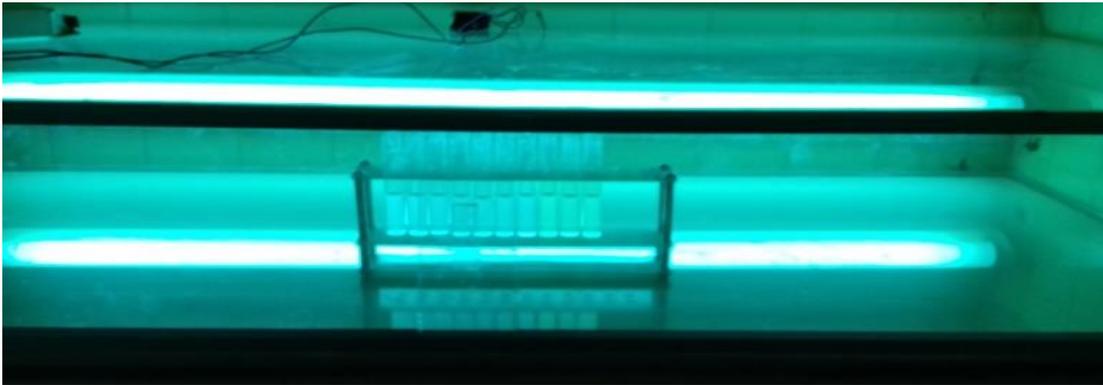
Anexo A: Control de calidad de material vegetal

		
Determinación de humedad	Determinación de cenizas Totales e insolubles en ácido	Determinación de cenizas solubles en agua

Anexo B: Tamizaje Fitoquímico

	
Tamizaje fitoquímico extracto etéreo	Tamizaje fitoquímico extracto alcohólico
	
Tamizaje fitoquímico extracto acuoso	

Anexo C: Exposición a radiación UV-B del extracto de *Passiflora mixta*, Pamidato-O y OMC

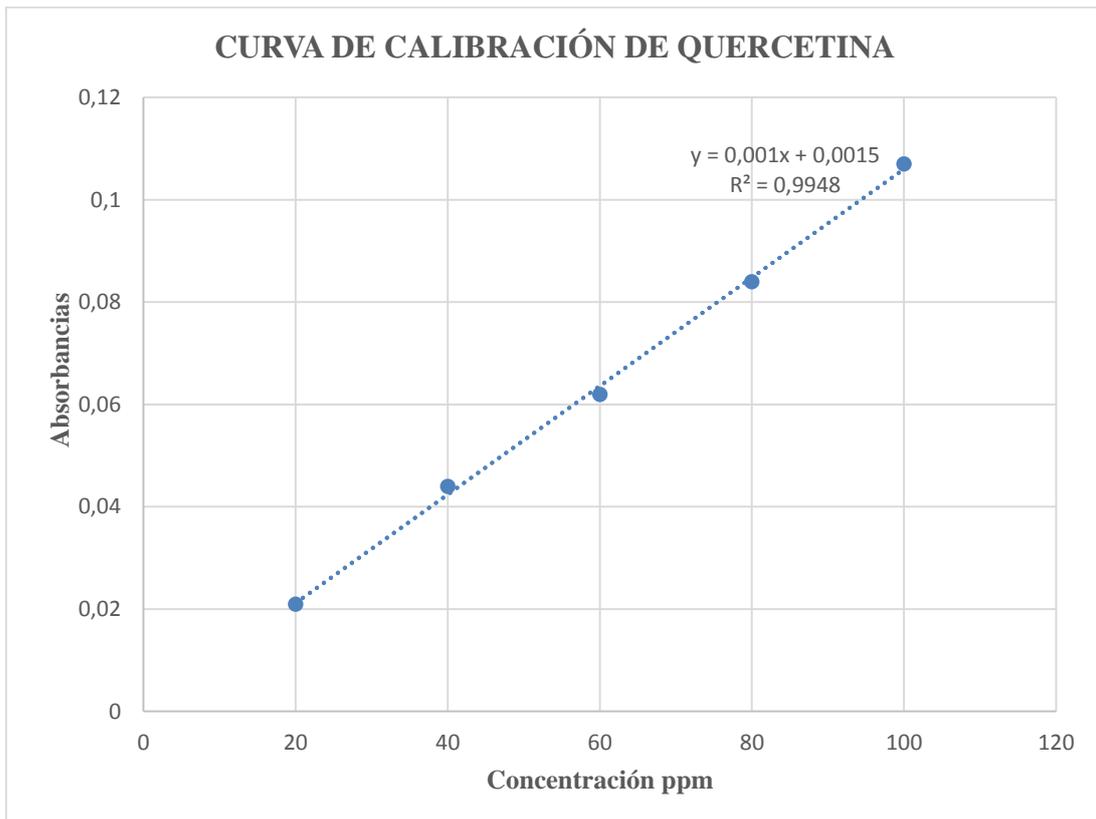


Anexo D: Colonias de *E. coli* sobrevivientes tras exposición a radiación UV-B, con el extracto de *Passiflora mixta* a 2000ppm

		
Tiempo de exposición a radiación UV-B 150 min.	Tiempo de exposición a radiación UV-B 90 min.	Tiempo de exposición a radiación UV-B 30 min.

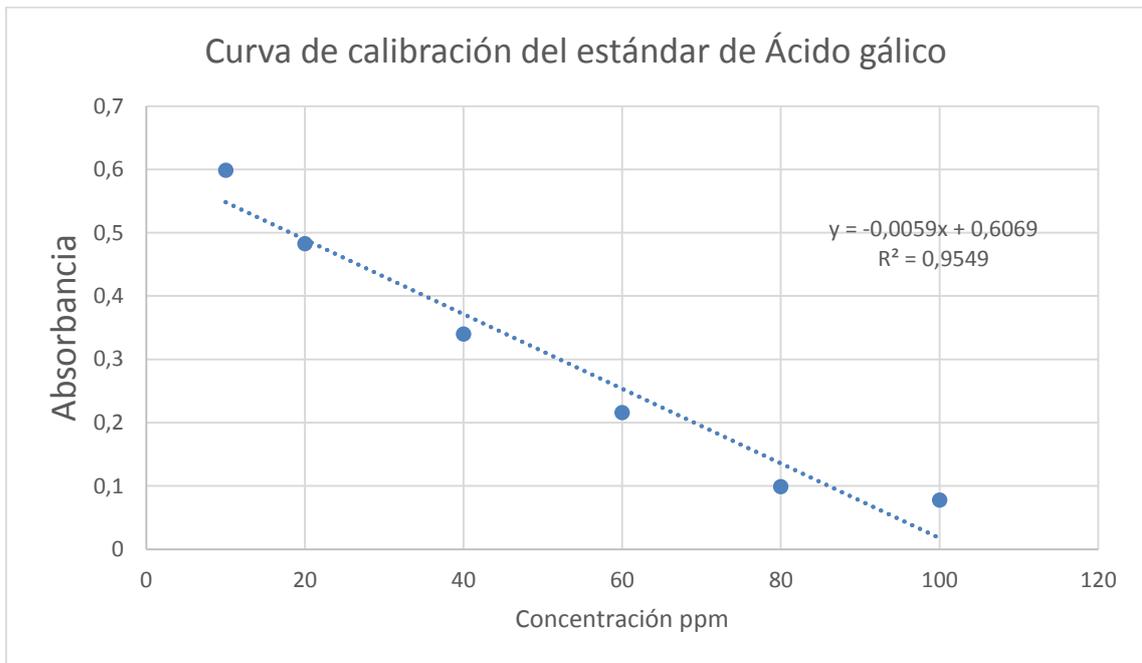
Anexo E: Curva de calibración del estándar de quercetina

Concentración (ppm)	Absorbancia (510 nm)
20	0,021
40	0,044
60	0,062
80	0,084
100	0,107



Anexo F: Curva de calibración del estándar de Ácido gálico, para la cuantificación de antioxidantes

Concentración/ppm	Absorbancia
10	0,599
20	0,483
40	0,34
60	0,216
80	0,099
100	0,078



Anexo G: Análisis estadístico de la actividad fotoprotectora, mediante muerte celular inducida

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Índice_fotoprotección

HSD de Tukey

(I) Fotoprotector a diferente concentración	(J) Fotoprotector a diferente concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Blanco	Pamidato-O 20	-207692000,000	75937386,402	,178	-454840944,45	39456944,45
	OMC 20	-222414000,000	75937386,402	,115	-469562944,45	24734944,45
	<i>P. mixta</i> 20	-496684666,667*	75937386,402	,000	-743833611,12	-249535722,21
	Pamidato-O 200	-301472666,667*	75937386,402	,006	-548621611,12	-54323722,21
	OMC 200	-223171333,333	75937386,402	,112	-470320277,79	23977611,12
	<i>P. mixta</i> 200	-613474666,667*	75937386,402	,000	-860623611,12	-366325722,21
	Pamidato-O 2000	-416203333,333*	75937386,402	,000	-663352277,79	-169054388,88
	OMC 2000	-415617333,333*	75937386,402	,000	-662766277,79	-168468388,88
	<i>P. mixta</i> 2000	-863715333,333*	75937386,402	,000	1110864277,79	-616566388,88
	Blanco	207692000,000	75937386,402	,178	-39456944,45	454840944,45
Pamidato-O 20	OMC 20	-14722000,000	75937386,402	1,000	-261870944,45	232426944,45
	<i>P. mixta</i> 20	-288992666,667*	75937386,402	,010	-536141611,12	-41843722,21
	Pamidato-O 200	-93780666,667	75937386,402	,964	-340929611,12	153368277,79
	OMC 200	-15479333,333	75937386,402	1,000	-262628277,79	231669611,12
	<i>P. mixta</i> 200	-405782666,667*	75937386,402	,000	-652931611,12	-158633722,21
	Pamidato-O 2000	-208511333,333	75937386,402	,174	-455660277,79	38637611,12
	OMC 2000	-207925333,333	75937386,402	,177	-455074277,79	39223611,12
	<i>P. mixta</i> 2000	-656023333,333*	75937386,402	,000	-903172277,79	-408874388,88
	Blanco	222414000,000	75937386,402	,115	-24734944,45	469562944,45
	Pamidato-O 20	14722000,000	75937386,402	1,000	-232426944,45	261870944,45
OMC 20	<i>P. mixta</i> 20	-274270666,667*	75937386,402	,018	-521419611,12	-27121722,21
	Pamidato-O 200	-79058666,667	75937386,402	,989	-326207611,12	168090277,79
	OMC 200	-757333,333	75937386,402	1,000	-247906277,79	246391611,12
	<i>P. mixta</i> 200	-391060666,667*	75937386,402	,000	-638209611,12	-143911722,21
	Pamidato-O 2000	-193789333,333	75937386,402	,258	-440938277,79	53359611,12
	OMC 2000	-193203333,333	75937386,402	,262	-440352277,79	53945611,12
	<i>P. mixta</i> 2000	-641301333,333*	75937386,402	,000	-888450277,79	-394152388,88
	Blanco	496684666,667*	75937386,402	,000	249535722,21	743833611,12
	Pamidato-O 20	288992666,667*	75937386,402	,010	41843722,21	536141611,12
	OMC 20	274270666,667*	75937386,402	,018	27121722,21	521419611,12
<i>P. mixta</i> 20	Pamidato-O 200	195212000,000	75937386,402	,249	-51936944,45	442360944,45
	OMC 200	273513333,333*	75937386,402	,018	26364388,88	520662277,79
	<i>P. mixta</i> 200	-116790000,000	75937386,402	,873	-363938944,45	130358944,45
	Pamidato-O 2000	80481333,333	75937386,402	,987	-166667611,12	327630277,79

	OMC 2000	81067333,333	75937386,402	,986	-166081611,12	328216277,79
	<i>P. mixta</i> 2000	-367030666,667*	75937386,402	,000	-614179611,12	-119881722,21
	Blanco	301472666,667*	75937386,402	,006	54323722,21	548621611,12
	Pamidato-O 20	93780666,667	75937386,402	,964	-153368277,79	340929611,12
	OMC 20	79058666,667	75937386,402	,989	-168090277,79	326207611,12
	<i>P. mixta</i> 20	-195212000,000	75937386,402	,249	-442360944,45	51936944,45
Pamidato -O 200	OMC 200	78301333,333	75937386,402	,989	-168847611,12	325450277,79
	<i>P. mixta</i> 200	-312002000,000*	75937386,402	,004	-559150944,45	-64853055,55
	Pamidato-O 2000	-114730666,667	75937386,402	,884	-361879611,12	132418277,79
	OMC 2000	-114144666,667	75937386,402	,887	-361293611,12	133004277,79
	<i>P. mixta</i> 2000	-562242666,667*	75937386,402	,000	-809391611,12	-315093722,21
	Blanco	223171333,333	75937386,402	,112	-23977611,12	470320277,79
	Pamidato-O 20	15479333,333	75937386,402	1,000	-231669611,12	262628277,79
	OMC 20	757333,333	75937386,402	1,000	-246391611,12	247906277,79
	<i>P. mixta</i> 20	-273513333,333*	75937386,402	,018	-520662277,79	-26364388,88
OMC 200	Pamidato-O 200	-78301333,333	75937386,402	,989	-325450277,79	168847611,12
	<i>P. mixta</i> 200	-390303333,333*	75937386,402	,000	-637452277,79	-143154388,88
	Pamidato-O 2000	-193032000,000	75937386,402	,263	-440180944,45	54116944,45
	OMC 2000	-192446000,000	75937386,402	,267	-439594944,45	54702944,45
	<i>P. mixta</i> 2000	-640544000,000*	75937386,402	,000	-887692944,45	-393395055,55
	Blanco	613474666,667*	75937386,402	,000	366325722,21	860623611,12
	Pamidato-O 20	405782666,667*	75937386,402	,000	158633722,21	652931611,12
	OMC 20	391060666,667*	75937386,402	,000	143911722,21	638209611,12
	<i>P. mixta</i> 20	116790000,000	75937386,402	,873	-130358944,45	363938944,45
P. mixta 200	Pamidato-O 200	312002000,000*	75937386,402	,004	64853055,55	559150944,45
	OMC 200	390303333,333*	75937386,402	,000	143154388,88	637452277,79
	Pamidato-O 2000	197271333,333	75937386,402	,236	-49877611,12	444420277,79
	OMC 2000	197857333,333	75937386,402	,232	-49291611,12	445006277,79
	<i>P. mixta</i> 2000	-250240666,667*	75937386,402	,045	-497389611,12	-3091722,21
	Blanco	416203333,333*	75937386,402	,000	169054388,88	663352277,79
	Pamidato-O 20	208511333,333	75937386,402	,174	-38637611,12	455660277,79
	OMC 20	193789333,333	75937386,402	,258	-53359611,12	440938277,79
	<i>P. mixta</i> 20	-80481333,333	75937386,402	,987	-327630277,79	166667611,12
Pamidato-O 2000	Pamidato-O 200	114730666,667	75937386,402	,884	-132418277,79	361879611,12
	OMC 200	193032000,000	75937386,402	,263	-54116944,45	440180944,45
	<i>P. mixta</i> 200	-197271333,333	75937386,402	,236	-444420277,79	49877611,12
	OMC 2000	586000,000	75937386,402	1,000	-246562944,45	247734944,45
	<i>P. mixta</i> 2000	-447512000,000*	75937386,402	,000	-694660944,45	-200363055,55
	Blanco	415617333,333*	75937386,402	,000	168468388,88	662766277,79
	Pamidato-O 20	207925333,333	75937386,402	,177	-39223611,12	455074277,79
OMC 2000	OMC 20	193203333,333	75937386,402	,262	-53945611,12	440352277,79
	<i>P. mixta</i> 20	-81067333,333	75937386,402	,986	-328216277,79	166081611,12
	Pamidato-O 200	114144666,667	75937386,402	,887	-133004277,79	361293611,12

	OMC 200	192446000,000	75937386,402	,267	-54702944,45	439594944,45
	<i>P. mixta</i> 200	-197857333,333	75937386,402	,232	-445006277,79	49291611,12
	Pamidato 2000	-586000,000	75937386,402	1,000	-247734944,45	246562944,45
	<i>P. mixta</i> 2000	-448098000,000*	75937386,402	,000	-695246944,45	-200949055,55
	Blanco	863715333,333*	75937386,402	,000	616566388,88	1110864277,79
	Pamidato 20	656023333,333*	75937386,402	,000	408874388,88	903172277,79
	OMC 20	641301333,333*	75937386,402	,000	394152388,88	888450277,79
	<i>P. mixta</i> 20	367030666,667*	75937386,402	,000	119881722,21	614179611,12
<i>P. mixta</i> 2000	Pamidato 200	562242666,667*	75937386,402	,000	315093722,21	809391611,12
	OMC 200	640544000,000*	75937386,402	,000	393395055,55	887692944,45
	<i>P. mixta</i> 200	250240666,667*	75937386,402	,045	3091722,21	497389611,12
	Pamidato-O 2000	447512000,000*	75937386,402	,000	200363055,55	694660944,45
	OMC 2000	448098000,000*	75937386,402	,000	200949055,55	695246944,45

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Fotoprotector a diferente concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Blanco	9	107333333,33				
Pamidato-O 20	9	1281025333,33	1281025333,33			
OMC 20	9	1295747333,33	1295747333,33			
OMC 200	9	1296504666,67	1296504666,67			
Pamidato-O200	9		1374806000,00	1374806000,00		
OMC 2000	9		1488950666,67	1488950666,67	1488950666,67	
Pamidato-O 2000	9		1489536666,67	1489536666,67	1489536666,67	
<i>P. mixta</i> 20	9			1570018000,00	1570018000,00	
<i>P. mixta</i> 200	9				1686808000,00	
<i>P. mixta</i> 2000	9					1937048666,67
Sig.		,112	,174	,249	,232	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,000.

Anexo H: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Indice_fotoproteccìon
N		90
Parámetros normales ^{a,b}	Media	1449377866,67
	Desviación típica	278112889,577
	Absoluta	,090
Diferencias más extremas	Positiva	,090
	Negativa	-,052
Z de Kolmogorov-Smirnov		,856
Sig. asintót. (bilateral)		,456

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo I: Certificado de identificación de *Passiflora mixta*

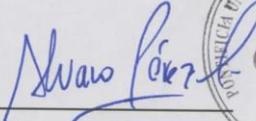
Quito, 06 de Febrero del 2017

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponden a:

Passiflora mixta* var. *mixta

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Rosanae Takht.
- Orden: Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl
- Familia Passifloraceae Juss. ex Roussel.
- Género: *Passiflora* L.
- Especie: *mixta* L. f.
- Nombre común: tacso de monte


Álvaro J. Pérez



Curador de Angiospermas Herbario QCA

Anexo J: Análisis estadístico de la actividad fotoprotectora, mediante muerte celular inducida



Oficio Nro. MAE-DPACH-2017-0342-O

Riobamba, 09 de marzo de 2017

Asunto: Autorización, trabajo de titulación "Determinación de la Actividad Fotoprotectora in vitro de Passiflora mixta "

Srta.
Jessica Murillo
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta al Documento No. MAE-DPACH-2016-1903. Me permito informar, que una vez realizada la valoración técnica del proyecto y presentados los requisitos establecidos, se realiza la entrega de la autorización de Investigación científica: Nro. 003-IC-DPACH-MAE-2017, con el tema "Determinación de la actividad fotoprotectora in vitro de Passiflora mixta ". La cual adjunto para su lectura y conocimiento de las obligaciones que asume en calidad de Investigador principal.

Por favor realizar los trámites pertinentes para cumplir con lo estipulado en la cláusula 14 de la autorización: "El investigador y la Universidad auspiciante deben firmar un convenio marco de acceso a recursos genéticos con el Ministerio del Ambiente, según lo establecido en Acuerdo Ministerial Nro. 024 mediante el cual se reforma el Acuerdo Ministerial Nro. 034 del 04-02-2015, en el lapso de 6 meses, caso contrario esta autorización no será válida.", con el propósito de evitar inconvenientes posteriores.

La fecha de entrega del informe final es el 25/08/2017.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,



Documento firmado electrónicamente

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

Referencias:
- MAE-DPACH-2016-1903

Papel Ecológico

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO
Av. 9 de Octubre y Delfino, Quinta Moray
Riobamba - Ecuador
Código Postal: 060103
Teléfono: 093 26 2610039
www.ambiente.gob.ec

1/2

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

No. 003-IC-DPACH-MAE-2017

FLORA X

FAUNA

VARIOS

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a:

Nombres y Apellidos	C.C.	Nacionalidad
Jéssica Mercedes Murillo Sánchez	1725068942	Ecuatoriana

Para llevar a cabo la investigación: "Determinación de la actividad fotoprotectora *in vitro* de *Passiflora mixta*"

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

- Solicitud de Jéssica Mercedes Murillo Sánchez
- Auspicio de institución científica nacional: ESPOCH (Dra. Susana Abdo, docente facultad de Ciencias).
- Auspicio de institución científica internacional: Ninguna
- Institución que financia la investigación: Autofinanciado
- Contraparte de la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo: Mvz. María Dolores Astudillo Vallejo, Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo
- Vigencia de esta Autorización: 01/03/2017 a 01/08/2017
- Fecha de entrega de informe final: 25/08/2017
- Valoración Técnica del Proyecto: Mvz. María Dolores Astudillo Vallejo
- Se autoriza la colección de: Muestra de *Passiflora mixta* de 200 g para su análisis en los Laboratorios de la escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH y depósito de una muestra en el Herbario "CHEP" de la ESPOCH.
- Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin el correspondiente permiso. Competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
- Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA/FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin la autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad o cada uno de los Centros de Tenencia y Manejo de Flora/Fauna (Herbarios/ Museos de Historia Natural) que cuente con patente vigente emitida por la Autoridad Ambiental.
- Los especímenes no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de bioprospección ni **ACCESO A RECURSO GENÉTICO**, la competencia de Acceso a Recurso genético es exclusiva del MAE, Unidad de Recursos Genéticos.
- De los resultados que se desprenda de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente.
- EL INVESTIGADOR Y LA UNIVERSIDAD AUSPICIANTE DEBEN FIRMAR UN CONVENIO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS CON EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, SEGÚN LO ESTABLECIDO EN ACUERDO MINISTERIAL NRO. 024 MEDIANTE EL CUAL SE REFORMA EL ACUERDO MINISTERIAL NRO. 034 DEL 04-02-2015 EN EL LAPSO DE 6 MESES. CASO CONTRARIO ESTA AUTORIZACIÓN NO SERÁ VÁLIDA.**

Obligaciones del investigador:

- Entregar a la Dirección provincial del Ambiente de Chimborazo, (02) dos copias del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Adjuntar el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las instituciones científicas ecuatorianas como internacionales depositarias de material biológico.
- Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colectó el material biológico.
- Entregar copias de las publicaciones a la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo
- Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión. (se respetara los derechos de autoría).

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 15, 16, 17, 18 se responsabilizan al solicitante e investigadores

SE AUTORIZA LA INVESTIGACION EN LAS PROVINCIAS, CANTONES:

Colección de muestra de *Passiflora mixta* en el cantón Penipe, Provincia de Chimborazo

SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL PROPÓSITO DE:

Determinar la actividad fotoprotectora de los extractos de *Passiflora mixta* mediante el establecimiento del perfil fitoquímico de las hojas y evaluación del efecto fotoprotector del extracto.

SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN:

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

MATERIALES Y EQUIPOS		
Adhesivos	Kitasato	Vidrio reloj
Aspersor	Pera de succión	Papel de empaque
Balón esmerilado	Pinza de cápsula	Papel aluminio
Cápsulas de porcelana	Pipetas volumétricas	Papel filtro
Crisoles	Piseta	Balanza analítica
Envases ámbar	Placas de sílica gel	Cámara UV
Embudo de Buchner	Probetas	Molino
Embudo simple	Reverbero	Sonificador
Embudo de reflujo	Termómetro	Estufa
Espátula	Tubos de ensayo	Rotavapor
Gradilla	Varilla de agitación	Mufla
Vasos de precipitación		

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

19. ESTA AUTORIZACIÓN FACULTA LA COLECCIÓN/ MANIPULACIÓN DE ESPECIMENES VIVOS, MISMOS QUE **NO PODRÁN** SER UTILIZADOS COMO MATERIAL PARENTAL PARA MANEJO COMERCIAL.
20. ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, EN TAL SENTIDO HABILITA EL MANEJO DE FAUNA/ FLORA O MICROORGANISMOS QUE HAYAN ESTADO EXPRESADOS EN LA PROPUESTA TÉCNICA TANTO EN TAXONES COMO EN NUMERO DE INDIVIDUOS.
21. LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECIMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.
22. PARA EL INGRESO A AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
23. PARA EL INGRESO A AREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO RESPONSABLE DE ÁREA.
24. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUBSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGIA DE ESTA INVESTIGACION.
25. SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES DEL ESTADO ETILICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.
26. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAIDAS POR EL INVESTIGADOR. ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
27. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
28. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE AREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA, Y DEMAS NORMATIVA PERTINENTE.
29. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE CODIFICADA, TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
30. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES DEPOSITADOS EN EL BANCO NACIONAL DE FOMENTO CUENTA 0010000785, CON REFERENCIA N° 580363900, RECIBO DE CAJA 2309



Ing. Marcelo Pino Cáceres
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO (E)

MA: 01/03/2017



Ministerio
del Ambiente
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL
AMBIENTE DE CHIMBORAZO