



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“FORMULACIÓN DE UN PROTECTOR SOLAR A BASE DE EXTRACTO ÑACHAG (*Bidens andicola*) Y DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD”

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTOR: PACHECO PACHECO DIANA STHEFANY

TUTOR: DRA. SUSANA ABDO

Riobamba-Ecuador

2018

2018, Diana Sthefany Pacheco Pacheco

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

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Diana Sthefany Pacheco Pacheco soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Diana Sthefany Pacheco Pacheco

DEDICATORIA

A Dios por llenar mi vida de amor, paz, felicidad y valentía, escudos que me ayudaron a vencer cualquier obstáculo que se me presentó durante el desarrollo de la tesis y sobre todo que me permitieron disfrutar de cada momento bueno o malo, que me han llenado de muchos conocimientos y experiencias que han fortalecido mi carrera como futura profesional Bioquímica Farmacéutica. A mis padres Ángel Pacheco y América Pacheco, a quienes dedico con mucho amor por enseñarme que con esfuerzo y dedicación todas las metas anheladas son posibles de hacerlas realidad, a mi hermano Miguel Pacheco por estar siempre pendiente de mi brindándome su apoyo y amor incondicional, a mi sobrino Erick Pacheco por sus millones de sonrisas compartidas y de manera especial se lo dedico a mi hermano José Luis Pacheco Pacheco, por ser mi ángel protector, que desde cielo me llenó de mucha fortaleza y sobre todo de alegría. A mi tutora Dra. Susana Abdo y mi asesor BQF. Diego Vinueza por ser docentes de calidad y excelentes seres humanos.

Diana Sthefany Pacheco Pacheco

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida y llenarme de muchas bendiciones. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por convertirse en mi segundo hogar y darme la oportunidad de prepararme para ser una excelente profesional.

A mi familia por su amor, consejos, apoyo, tiempo y paciencia dedicados hacia mí de manera incondicional, ayudándome con entusiasmo a lograr terminar la tesis.

A mis amigas Johanna Morales y Mayra Guaita por su apoyo y amistad sincera que hemos compartido durante la trayectoria académica y de investigación.

A mi Tutora Susana Abdo y mi asesor BQF. Diego Vinueza, por todo el esfuerzo, tiempo, dedicación y conocimientos impartidos en el desarrollo de la tesis, creando un ambiente de trabajo en equipo y a BQF. Benjamín Román y la Ing. Carla Haro por su ayuda y amistad brindada de manera incondicional.

Y a todas aquellas personas de las cuales recibí su apoyo, Dios les bendiga.

Diana Sthefany Pacheco Pacheco

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BCC	Cáncer de Células Basales
CAM-TBS	Ensayo de Irritación de la Membrana Corioalantoidea con Azul de Tripán
COLIPA	Asociación Europea de Cosméticos y Perfumería
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAC	Dermatitis Alérgica de Contacto
EXA	Agencia Espacial Civil Ecuatoriana
ECVAM	Centro Europeo para la validación de Métodos Alternativos
FPS	Factor de Protección Solar
FEPSO	Fundación Ecuatoriana de Psoriasis
FDA	Food and Drugs
HBL	Equilibrio Hidrófilo-Lipófilo
HET-CAM	Ensayo de Irritación Ocular mediante la Membrana Corioalantoidea
ICNIRP	Comisión Internacional de Protección contra la Radiación no Ionizante
IUV	Índice de Radiación Ultravioleta
IFIR	Instituto Físico de la Ciudad del Rosario
MED	Dosis mínima eritematosa
MMP	Metaloproteinasas
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMM	Organización Meteorológica Mundial
ROS	Sustancias reactivas de oxígeno
RUV	Radiación Ultravioleta
SCCNFP	Organismo Asesor Científico de la Comisión Europea
SCC	Cáncer de Células Escamosas

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1 El sol	5
1.2 Radiación solar	5
1.2.1 Radiación ultravioleta (RUV)	6
1.2.2 Índice de radiación UV (IUV)	7
1.3 Generalidades de la piel.....	9
1.4 Interacción de la radiación UV y la piel.....	14
1.5 Foto-envejecimiento cutáneo prematuro	15
1.6 Quemadura solar.....	16
1.7 Fotocarcinogénesis	17
1.8 Fotoprotección.....	19
1.8.1 Factor de Protección Solar (FPS)	20
1.8.2 Protector solar	21
1.9 Componentes de fotoprotectores que causan problemas de salud.....	24
1.10 Fitocosméticos.....	25
1.10.1 Fitoingredientes cosméticos	25
1.11 <i>Bidens andicola</i>	28
1.11.1 Clasificación científica.....	28

1.11.2	<i>Descripción botánica</i>	28
1.11.3	<i>Usos terapéuticos</i>	29
1.11.4	<i>Composición, principios activos y actividad farmacológica</i>	29
1.12	Mecanismos de fotoprotección en plantas	29
1.12.1	<i>Agentes antioxidantes</i>	30
1.13	Emulsiones	32
1.13.1	<i>Componentes de la crema fotoprotectora</i>	32

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	36
2.1	Localización y recolección de la droga vegetal	36
2.2	Acondicionamiento y control de calidad de la droga vegetal	36
2.2.1	<i>Análisis del contenido de humedad</i>	36
2.2.2	<i>Análisis del contenido de cenizas totales</i>	37
2.2.3	<i>Análisis del contenido de cenizas solubles en agua</i>	37
2.2.4	<i>Análisis del contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	38
2.3	Tamizaje fitoquímico de la droga vegetal	38
2.4	Medición del Factor de Protección Solar de los extractos de <i>Bidens andicola</i>	39
2.5	Control de calidad del extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>	41
2.6	Análisis del contenido de flavonoides totales expresados como quercetina	41
2.7	Análisis del contenido de fenoles totales	42
2.8	Determinación de la capacidad antioxidante	43
2.9	Barrido espectrofotométrico con el extracto etanólico <i>Bidens andicola</i>	44
2.10	Prueba de irritación ocular del extracto etanólico al 96% de <i>Bidens andicola</i>	44
2.11	Preparación de las formulaciones con extracto <i>Bidens andicola</i>	46
2.12	Control de calidad de las cremas fotoprotectoras	47
2.12.1	<i>Determinación del Factor de Protección Solar de las cremas fotoprotectoras</i>	47
2.12.2	<i>Ensayo de irritación de la membrana corioalantoidea con azul de tripán</i>	47
2.12.3	<i>Determinación de los requisitos organolépticos</i>	49
2.12.4	<i>Medición del pH</i>	49

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
3.1	Control de calidad de la droga vegetal	50
3.1.1	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	50

3.1.2	<i>Determinación del contenido de cenizas totales</i>	51
3.1.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	51
3.1.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	51
3.2	Tamizaje Fitoquímico	51
3.3	Factor de Protección Solar (FPS) <i>in vitro</i>	53
3.4	Extrapolación del Factor de Protección Solar (FPS) <i>in vitro</i>	55
3.5	Control de calidad del extracto etanólico al 96% de <i>Bidens andicola</i>	57
3.5.1	<i>Parámetros organolépticos</i>	57
3.5.2	<i>Parámetros físicos</i>	57
3.6	Contenido de flavonoides totales.....	58
3.7	Contenido de fenoles totales	59
3.8	Capacidad captadora de radicales libres	61
3.9	Barrido espectrofotométrico del extracto etanólico <i>Bidens andicola</i>	63
3.10	Prueba de Irritación Ocular HET-CAM	64
3.11	Control de calidad de la crema fotoprotectora.....	64
3.11.1	<i>Factor de Protección Solar (FPS) de las cremas fotoprotectoras</i>	64
3.11	Ensayo de irritación de la membrana corioalantoidea con azul de tripán	67
3.11.3	Evaluación de las características organolépticos de la crema fotoprotectora	68
3.11.4	<i>Parámetro físico</i>	68
CONCLUSIONES.....		70
RECOMENDACIONES.....		71
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Categorización del IUV	8
Tabla 2-1. Índice de Radiación UV en Ecuador.....	8
Tabla 3-1. Tipos de piel según la secreción	13
Tabla 4-1. Fototipos de piel y respuesta biológica frente a la exposición solar.....	17
Tabla 5-1. Tasa de incidencia de cáncer cutáneo en Quito-Ecuador.....	18
Tabla 6-1. FPS según los tipos de piel y el UVI	20
Tabla 7-1. Sustancias de protección solar permitidos en Europa y EE. UU	23
Tabla 8-1. Características de los filtros químicos y físicos.....	23
Tabla 9-1. Principales filtros biológicos	24
Tabla 10-1. Clasificación científica de <i>Bidens andicola</i>	28
Tabla 11-1. Características generales y específicas para la selección del vehículo	33
Tabla 1-2. Extractos de <i>Bidens andicola</i> utilizando diferentes solventes	40
Tabla 2-2. Función del producto normalizada para el cálculo del FPS.....	41
Tabla 3-2. Tipo de fotoprotector según el FPS establecido por COLIPA.....	41
Tabla 4-2. Categorización de irritación.....	45
Tabla 5-2. Formulaciones de cremas fotoprotectoras al 100%	46
Tabla 6-2. Categorización del CAM-TBS.....	48
Tabla 1-3. Resultados del control de calidad de la droga vegetal.	50
Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	52
Tabla 3-3. Resultados del Factor de Protección Solar (FPS) <i>in vitro</i>	53
Tabla 4-3. Tipo de fotoprotector según el FPS <i>in vitro</i> de los extractos de <i>Bidens andicola</i>	54
Tabla 5-3. Extrapolación del factor de Protección Solar del extracto etanólico	55
Tabla 6-3. Parámetros organolépticos del extracto etanólico <i>Bidens andicola</i>	57
Tabla 7-3. Determinación de los parámetros físicos del extracto <i>Bidens andicola</i>	57
Tabla 8-3. Absorbancia del estándar de quercetina.....	58
Tabla 9-3. Resultado del contenido de flavonoides totales del extracto <i>Bidens andicola</i>	59
Tabla 10-3. Absorbancias del estándar de ácido gálico	60
Tabla 11-3. Resultado del contenido de fenoles totales del extracto <i>Bidens andicola</i>	60
Tabla 12-3. Porcentaje de captación del radical libre DPPH* del extracto <i>Bidens andicola</i>	61
Tabla 13-3. Ensayo HET-CAM de los extractos etanólicos de <i>Bidens andicola</i>	64
Tabla 14-3. Resultados del Factor de Protección Solar de las cremas fotoprotectoras	65
Tabla 15-3. Formulación 1 de elección que contiene aceite de oliva al 100%.....	66
Tabla 16-3. Resultados del método CAM-TBS de la crema fotoprotectora	67
Tabla 17-3. Evaluación de las características organolépticas de la crema fotoprotectora	68
Tabla 18-3. Resultado de los parámetros físicos de la crema fotoprotectora	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Tipos de radiaciones del espectro solar.....	6
Figura 2-1. Absorción de la luz UV en la piel	7
Figura 3-1. Principales capas de la piel.....	10
Figura 4-1. Capas de la epidermis.....	11
Figura 5-1. pH de la piel	13
Figura 6-1. Espectro de la radiación solar.....	15
Figura 7-1. Fotoenvejecimiento prematuro de la piel	16
Figura 8-1. Quemadura solar en la piel.....	17
Figura 9-1. Cáncer de piel de células basales. Cáncer de piel de células escamosas.....	19
Figura 10-1. <i>Bidens andicola</i>	28
Figura 11-1. Estructura de un polifenol	30
Figura 12-1. Estructura química y tipos de flavonoides	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. Factor de protección solar para los diferentes extractos de <i>Bidens andicola</i>	54
Gráfico 2-3. Curva de calibración del extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>	56
Gráfico 3-3. Curva de calibración de quercetina estándar	58
Gráfico 4-3. Curva de calibración del ácido gálico.....	60
Gráfico 5-3. Picos del barrido espectrofotométrico del extracto <i>Bidens andicola</i>	63
Gráfico 6-3. Factor de protección solar de las formulaciones con extracto <i>Bidens andicola</i>	65

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Evidencias fotográficas de la investigación

RESUMEN

El objetivo del trabajo de titulación fue formular un protector solar a base de extracto de Ñachag (*Bidens andicola*) y determinar su calidad. Se realizó el control de calidad de la droga vegetal. El tamizaje fitoquímico confirmó la presencia de compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides presentes en las partes aéreas de *Bidens andicola*. El contenido de fenoles totales, flavonoides totales y la capacidad captadora de antioxidantes se determinó por métodos espectrofotométricos. Se preparó varias formulaciones de cremas fotoprotectoras. Se evaluó la actividad fotoprotectora de los extractos de *Bidens andicola* y de las cremas fotoprotectoras mediante la determinación del Factor de Protección Solar, aplicando la ecuación de Mansur. Se realizó el control de calidad y seguridad del extracto etanólico *Bidens andicola* y la crema fotoprotectora mediante los ensayos: HET-CAM y CAM-TBS respectivamente. El extracto que presentó las mejores características fue el extracto etanólico de *Bidens andicola* a 600ppm que presentó un FPS de 23. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue de 178 mg GAE/g planta seca y 71,4 mg QE/g planta seca respectivamente. Se confirmó la capacidad captadora de antioxidantes obteniendo absorbancias con el mismo comportamiento que el estándar. La formulación de elección con aceite de oliva presentó un FPS de 23. Los ensayos HET-CAM y CAM-TBS demostraron que el extracto etanólico y la crema fotoprotectora no son irritantes. Los resultados obtenidos cumplen con la norma COLIPA de eficacia de productos cosméticos. La crema fotoprotectora es eficaz e inocua a nivel tópico. Se recomienda estudios microbiológicos, reológicos y de estabilidad para garantizar la efectividad de la crema.

Palabras clave: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <FARMACOLOGÍA>, <ÑACHAG (*Bidens andicola*)>, <EXTRACTO ETANÓLICO>, <FLAVONOIDES TOTALES>, <FOTOPROTECCIÓN>, <FORMULACIÓN FOTOPROTECTORA>, <ENSAYO HET-CAM>, <ENSAYO CAM-TBS>.

ABSTRACT

The main purpose of this research was to formulate a sunscreen based on Ñachag extract (*Bidens andicola*) and determine its quality. The quality control of the vegetable drug was carried out. The phytochemical screening demonstrated the presence of phenolic compounds, from which, the flavonoids in the aerial parts of *Bidens andicola*. The content of total phenols and flavonoids, as well as the capacity to capture antioxidants was determined by spectrophotometric methods. Several formulations of photo protective creams were prepared. The photo protective activity of the *Bidens andicola* extracts and the photo protective creams were evaluated by determining the sun protection factor by applying the Mansur equation. The quality and safety control of *Bidens andicola* ethanolic extract, and the photo protective cream were carried out by the tests: HET-CAM (Test of eye irritation by means of the chorioallantoic membrane of chicken egg) and CAM-TBS (Test of eye irritation by means of the chorioallantoic membrane of chicken egg with *Trypan Blue*) respectively. The extract that showed the best characteristics was the one containing the ethanol extract of *Bidens andicola* at 600ppm, which had an SPF of 23. The content of phenols and total flavonoids was 178 mg GAE / g dry plant and 71.4 mg QE / g dry plant respectively. The effectiveness of the sunscreen to capture antioxidants was verified by obtaining absorptances with the same performance as the standard. The formulation of choice containing olive oil presented an SPF of 23. The HET-CAM and CAM-TBS tests reported that the ethanolic extract and the sunscreen cream are not irritating. The results obtained comply with the COLIPA standard of efficacy of cosmetic products. The photo protective cream is effective and safe at topical level. Microbiological, rheological and stability studies are recommended to guarantee the effectiveness of the cream.

KEYWORDS:

<EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <PHARMACOLOGY>, <ÑACHAG (*bidens andicola*)>, <ETHANOLIC EXTRACT>, <TOTAL FLAVONOIDS>, <PHOTO PROTECTION>, <PHOTO PROTECTING FORMULATION>, <HET-CAM TEST>, <CAM-TBS TEST>.

INTRODUCCIÓN

La radiación solar desde hace décadas es considerada muy importante para la salud de los seres vivos, ya que en pequeñas dosis ayuda a la estimulación de la síntesis de vitamina D, la absorción de calcio en los huesos y favoreciendo por la presencia de esta vitamina a prevenir enfermedades como la osteoporosis o el raquitismo, también se utiliza para tratar la dermatosis, ayuda a la circulación sanguínea e interviene en la síntesis de los neurotransmisores como la serotonina responsable del estado de ánimo (Ballesteros, 2010, p.1).

Existen tres tipos de radiación solar, que son: UV-A, UV-B y UV-C, de las cuales la última se absorbe en su totalidad por la atmósfera y no llega a la superficie terrestre. Mientras que los rayos del tipo UV-A atraviesan en gran cantidad la superficie terrestre (95%), siendo la responsable del envejecimiento prematuro de la piel y de la formación de radicales libres. La radiación UV-B atraviesa en menor cantidad (5%) y puede ocasionar: lesión ocular, daños en el sistema inmunológico, quemaduras leves y crónicas de la piel, dando lugar a mutaciones del ADN, conllevando a la aparición de cáncer de piel de tipo melanoma o no melanoma (Ballesteros, 2010, pp.4-6).

En estos últimos años la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Organización Meteorológica Mundial (OMM) y la Comisión Internacional de Protección contra la Radiación no Ionizante (ICNIRP), establecieron el índice UV Mundial Solar (IUV). Parámetro que depende de varios factores como la altura del sol, latitud y nubosidad. La escala de tolerabilidad va de 0 a 11 categorizándose desde baja hasta extremadamente alta. El valor de IUV en éstos últimos años ha sobrepasado el nivel tolerable por a piel. La contaminación medioambiental a deteriorado la atmósfera y la capa de ozono afectando su estructura y disminuyendo en gran medida la capacidad para absorber las radiaciones ultravioletas. Por lo que la radiación UV-A y UV-B han logrado atravesar con mayor intensidad hacia la superficie terrestre, siendo uno de los problemas que afecta la salud de la población (OMS, 2003, pp.6-15).

La exposición prolongada a la radiación solar es muy perjudicial para la salud, los órganos más sensibles son la piel y los ojos debido a que están directamente expuestos, causando el fotoenvejecimiento cutáneo, foto-sensibilidad y la fotocarcinogénesis. Los mismos que se han

convertido en uno de los problemas de salud más frecuentes en la población. Es así que la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer en Ecuador (SOLCA, 2010) dio a conocer que de todos los tipos de cáncer de piel registrados el 38,2% corresponde al cancer de tipo melanoma, siendo de mayor prevalencia en hombres de 0,9 por cada 100.000 habitantes que en las mujeres de 0,1 por cada 100.000 habitantes (Mora, 2015,p.1) ((SOLCA, 2010, pp.102-103).

Estudios realizados por la Agencia Espacial Civil Ecuatoriana (EXA), muestran que Ecuador es uno de los países con más alta emisión de radiación solar, debido a que se localiza cerca de la línea ecuatorial. La altitud de 2700 msnm registró los mayores índices. Quito en el 2008 registró un IUV de 24 y Riobamba un IUV de 16 considerándose extremadamente altos y dañinos para la población (Mora, 2015,pp.5-10).

Los mecanismos de protección con los que contamos los seres humanos, tenemos en primer lugar la piel, ya que una de sus funciones es que actúa como barrera de defensa endógena frente a la radiación UV, gracias a que posee componentes como la melanina, ácido urocánico y el triptófano, que son sustancias que tienen la capacidad de fotoprotección endógena. La melanina es considerada como un potente fotoprotector ya que es capaz de absorber y dispersar la radiación UV. Sin embargo, ésta barrera no es suficiente, por lo que es necesario contar con otras fuentes de fotoprotección como la ropa, sombreros, gafas con protección UV, sombrillas en otras. Y como segunda barrera es el uso de protectores solares orgánicos e inorgánicos (Giraldo, et al., 2014,pp.273-275).

Motivo por el cual las Industrias Cosméticas han visto la necesidad de crear productos cosméticos que contengan sustancias activas de origen natural, denominándose como productos cosmeceúticos, que a más de embellecer la piel otorgan un beneficio para la salud de las personas, es así que comenzaron a elaborar los protectores solares que pueden ser de dos tipos los que contienen filtros solares químicos y filtros solares físicos. Sin embargo, estudios recientes muestran que estos tipos de protectores solares presentan efectos perjudiciales sobre la piel, ya que pueden generar dermatitis fotoalérgica, debido a la presencia de compuestos químicos en la formulación. Se ha identificado que algunos compuestos son capaces de penetrar las capas más profundas de la piel llegando al torrente sanguíneo causando disminución en su capacidad fotoprotectora e incluso la aparición de efectos tóxicos locales o sistémicos. Mientras que los protectores de naturaleza física, debido al tamaño de su partícula en las formulaciones no logran brindar una adecuada pantalla de protección solar sobre la piel (Giraldo, et al., 2014,p.273).

Por lo anterior, se ve la necesidad de mejorar la eficacia de los protectores solares tradicionales creando una segunda línea de defensa sobre la piel y disminuyendo sus efectos perjudiciales, a través de la utilización de ingredientes activos de origen natural. Varios investigadores han demostrado que algunas especies vegetales contienen metabolitos secundarios con actividad fotoprotectora. Estos compuestos son capaces de proteger a las células de las mismas plantas, y también son capaces de proteger las células humanas. En estudios *in vitro/in vivo* ya se han incluido formulaciones de cremas fotoprotectoras como principios activos de origen vegetal (Giraldo, Atehortúa and Mejía, 2014,p.3).

Esta investigación tiene como objetivo la formular un protector solar a base de extracto de Ñachag (*Bidens andicola*) y la determinar su calidad”, ya que estudios realizados a nivel *in vitro* Tinajero (2015), indica que la planta Ñachag contienen metabolitos secundarios de naturaleza fenólica como son los flavonoides, catequinas, ácidos fenólicos entre otros, los cuales le otorgan una alta actividad fotoprotectora y antioxidante, por lo que *B. andicola* es ideal como principio activo para la elaboración de un protector solar, además de su fácil acceso por ser una planta andina ecuatoriana. Estudios de Vinuesa, et al. (2017) a nivel *in vitro* indican que *B. andicola* contiene un 9,987% de flavonoides totales y un 12,058% de compuestos fenólicos totales, resultados que muestran que la planta posee actividad fotoprotectora y además determinaron que posee actividad antiinflamatoria al comparar el extracto hidroalcohólico de *B. andicola* con la aspirina.

Para las formulaciones de las cremas fotoprotectoras se utilizó en su mayoría excipientes de origen natural como: aceite de oliva, aceite de aguacate, aceite de coco y aceite de girasol, con la finalidad de obtener un efecto sinérgico con el principio activo. La crema fue sometida a pruebas de control de calidad como la determinación del FPS, el ensayo de irritación de la membrana corioalantoidea con azul de tripán (CAM-TBS), pruebas físicas y la evaluación de sus características organolépticas, con el fin de elegir la mejor crema fotoprotectora que garantice su seguridad y calidad.

La Asociación Europea de Cosmética y Perfumería (COLIPA) en colaboración con el Organismo Asesor Científico de la Comisión Europea (SCCNFP) y el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), se centran en la búsqueda de ensayos o métodos alternativos para eliminar o sustituir experimentos en animales o seres humanos cuando sea posible, es así que lograron la eliminación de la prueba Draize, prueba que medía la irritación ocular en animales

(conejos). Ahora se utiliza la prueba HET-CAM para la determinación de irritación ocular en productos cosméticos, mediante ensayos en huevos de gallinas fecundados. Sin embargo, no lograron la sustitución o eliminación de algunas pruebas a nivel *in vivo*, para ello COLIPA estableció que para realizar este tipo de investigaciones los Establecimientos o Instituciones deben contar con una Comisión de Bioética, para garantizar la seguridad de los seres humanos voluntarios que se sometan a ensayos y/o para los animales de experimentación (COLIPA, 2005,pp.14-16)(Espa, 2009,pp.2-6).

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo no presenta aún la Comisión de Bioética, motivo por el cual la presente investigación se ha centrado en la realización de estudios a nivel *in vitro*, la cual se llevó a cabo en los laboratorios de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 El sol

Estrella luminosa que se considera como eje central del sistema planetario, en cuyo interior ocurren varias reacciones de fusión nuclear, ocasionando pérdida de masa que se convierte en energía. La energía liberada por el sol llega hacia la superficie terrestre como radiación solar, que por siglos el hombre lo ha considerado de vital importancia para la vida ya que es la principal fuente de luz y de energía que nos proporciona calor y es el responsable del bronceado de la piel. Así también la luz solar en pequeñas dosis desempeña varias funciones benéficas en los seres vivos, como:

- Interviene en la estimulación de la síntesis de vitamina D, la cual ayuda a que el calcio se absorba y se fije en los huesos, siendo importante para la salud ósea y musculoesquelética. La síntesis de la vitamina D inicia cuando la radiación solar UV-B, transforma fotoquímicamente el deshidrocolesterol de la epidermis en previtamina D3 que por ser foto-inestable posterior se convierte en vitamina D3. De esta manera previene la aparición de cierta patología como la osteoporosis y el raquitismo. Por lo que se recomienda la exposición al sol entre 10 a 15 minutos al día.
- Interviene en la síntesis de neurotransmisión cerebral, responsable del estado de ánimo de las personas. Por lo que el sol se utilizaba en los tratamientos para la depresión estacional (Zaragozano, et al, 2016,p 49)(Samaniego, 2017,p.9).

1.2 Radiación solar

Conjunto de ondas electromagnéticas emitidas por el sol que presentan un amplio espectro el cual va desde el ultravioleta (100 a 400 nm) que constituye el 10% de la energía solar, luz visible (400 a 760 nm) que constituye un 50% y el infrarrojo (760 a 1800 nm) que constituye el 40% aproximadamente, aquellas radiaciones con longitudes de ondas cortas se absorben en la atmósfera y la capa de ozono, por lo que no toda la radiación solar llega a la superficie terrestre y

aquellos porcentajes dependen de varios factores como la altura del sol, latitud, nubosidad y hora del día (Giraldo, et al., 2014,pp.272-273).



Figura 1-1. Tipos de radiaciones del espectro solar

Fuente: (Lopez, 2012,p.36)

1.2.1 Radiación ultravioleta (RUV)

La radiación UV actúan de manera principal sobre la piel, una prolonga exposición al sol es capaz de ocasionar graves problemas sobre la salud de la piel, en los ojos y en el sistema inmunitario. Existen tres tipos de radiación UV que son:

- La radiación UV-A: presenta una longitud de onda de 320 a 400 nm, atraviesa un 95% a la superficie terrestre y tiene la capacidad de penetrar a nivel de la dermis en un 50% de UV-A. Representa para la piel un menor peligro ya que es poco energética, por lo que una exposición prolongada produce la pigmentación en la piel debido a la melanina ya que sufre fotooxidación, así también la UV-A ocasiona estrés oxidativo en la piel al activar las especies de oxígeno reactivo (ROS), que en algunos casos son capaces de activar de manera inapropiada las células que causan daño en la piel, provocando fotoenvejecimiento cutáneo, fotosensibilidad, lesión en la retina y lesiones precancerosas.
- La radiación UV-B: la longitud de onda es de 280 a 320 nm, atraviesa el 5% a la superficie terrestre, es más energética por lo que se absorbe en un 70% hasta el estrato córneo de la epidermis, penetra hasta la hipodermis, es la responsable de la mayoría de los daños biológicos producidos por la luz solar, como: el desarrollo de eritemas, mutaciones en el ADN de la células de la piel que conllevan al origen de cáncer de piel de tipo melanómico y no melanómico, debido a que este tipo de radiación se absorbe en el ADN de la dermis por lo que penetra en las capas más profundas de la epidermis. Induce a la aparición de

manchas claras u oscuras, también es capaz de reducir la eficacia del sistema inmunológico, ya que es inmunosupresor a nivel local afectado a las células de langerhans, células responsables de la producción de antígenos en la epidermis, dejando vulnerable al cuerpo contra el ataque de bacterias, virus u hongos. A nivel de los ojos la radiación UV-B es la principal responsable del desarrollo de cataratas y de pterigios.

- La radiación UV-C: es la más energética ya que presenta una longitud de onda que va de 100 a 280 nm, esta radiación se absorbe en su totalidad por la atmósfera y la capa de ozono, por lo que no llega a la superficie terrestre (Olarte *et al.*, 2016,pp.44-45)(Ballesteros, 2010,pp.6-7).

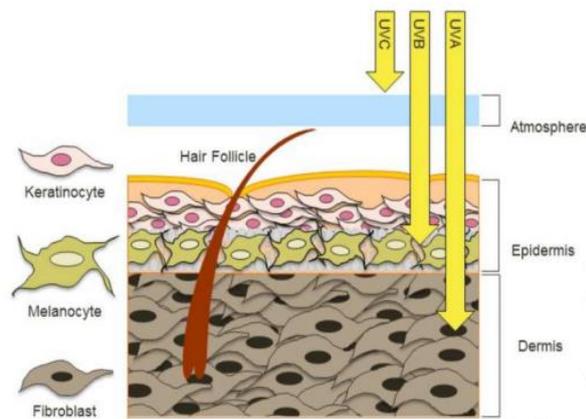


Figura 2-1. Absorción de la luz UV en la piel

Fuente: (Samaniego, et al, 2017,p.8)

1.2.2 Índice de radiación UV (IUV)

Parámetro establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en colaboración por la Organización Meteorológica Mundial (OMM), que indican la intensidad de radiación solar UV-B que llega hacia la superficie terrestre. La medición del IUV se representa a través de una escala numérica que va de 0 a 11, categorizándolo desde un IUV bajo hasta extremadamente alto el daño celular que puede producir en la piel, como se puede apreciar en la tabla 1-1:

Tabla 1-1. Categorización del IUV

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

Fuente: (OMS, 2003,p.6)

La Fundación Ecuatoriana de Psoriasis (FEPSO) utiliza para Ecuador la escala de IUV propuesta por el Instituto Físico de la ciudad del Rosario Argentina (IFIR), que es una escala con rangos más extensos debido a que la radiación solar es mucho más intensa en los países que conforman América Latina, es por ello que la mayoría de los habitantes tiene la piel oscura (Arteaga and Pazmiño, 2013,p.13).

Tabla 2-1. Índice de Radiación UV en Ecuador

Categoría	Rango
Muy bajo	0-3
Bajo	4-5
Moderado	6-7
Alto	8-10
Muy alto	11-15
Extremo	Mayor a 16

Fuente: (Arteaga and Pazmiño, 2013, citados en IFIR,FEPSO,P.13)

La OMS estableció el IUV con el fin de dar a conocer sobre los niveles de radiación solar que se pueden presentar a lo largo del día y de esta manera prevenir sobre los efectos perjudiciales que puede ocasionar una exposición muy prolongada al sol a ciertas horas del día mediante el uso de métodos de protección (OMS, 2003,p.4).

La OMS establece una serie de recomendaciones para protegerse de la radiación solar, que son:

- No exponerse al sol en las horas centrales del día (12, 2 y 4 pm).
- Usar prendas de protección como: ropa, gafas de sol, sombrero, guantes, etc.
- Utilizar protector solar con un Factor de Protección Solar (FPS) mayor o igual a 15, aplicarse 30 minutos antes de exponerse al sol y varias veces al día.

- No usar las cámaras de bronceado.
- Proteger especialmente a los bebés y a los niños contra los rayos solares (OMS, 2003,p.8).

1.3 Generalidades de la piel

Órgano más grande y de vital importancia que el ser humano pudo lograr desarrollar durante su evolución, actúa como cubierta externa capaz de preservar la estabilidad del medio interno del cuerpo humano, mide aproximadamente entre 1.6 a 1.9 m^2 , presenta un espesor de 0.05 cm a 0.3 cm y su peso total aproximado es de 4kg, que en porcentaje representa el 30% del peso total corporal de una persona adulta. Según la localización de la piel en el organismo puede ser pilosa a nivel de la cabeza, gruesa en el sitio del tronco y dura a nivel de las palmas de las manos y plantas de los pies a nivel y a nivel de los genitales externos la piel es delgada (Manteca, 2013,pp.7-8) (Sanford and Gallo, 2013,p.370).

La piel se encuentra constituida por tres capas que son:

- Epidermis

Capa externa de la piel, que separa el cuerpo humano del entorno, su grosor es de 50 a 150um. Esta constituía principalmente por varias células de las cuales las principales son: los melanocitos y los queratinocitos y en pequeñas cantidades están las células de langerhands y las células de Merkel (Maris *et al*, 2016,p.10).

Los queratinocitos a su vez están formados por cinco capas: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y el estrato córneo (capa más externa de la piel). Estas capas se forman a partir del proceso de queratinización donde los queratinocitos se transforman de manera gradual dando origen a estas capas las cuales cada una de ellas cumple con funciones específicas. Las demás células que forman parte de la epidermis como los melanocitos, células de langerhands y de Merkel se distribuyen dentro de estas cinco capas mencionadas anteriormente (Manteca, 2013,pp.8-9).

Los melanocitos son células dendríticas (células inmunitarias) que sintetizan la melanina gracias a la intervención de la enzima tirosinasa la cual se activa por la radiación solar, que primero convierte al aminoácido tirosina en 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA). La tirosinasa actúa también sobre la DOPA y luego de una serie de transformaciones se convierte en melanina, que es un pigmento que desempeña una función muy importante en la piel brindando protección a las células queratinocitos ya que es capaz de absorber las radiaciones UV emitidas por el sol (Sevilla, 2017,p.10).

- Dermis

Está constituida por diferentes células como: los fibroblastos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos, estos últimos se encuentran en mayor cantidad. Estas células cumplen funciones específicas es así que los fibroblastos que encargan de la síntesis del colágeno (elemento más importante de la dermis que otorga resistencia mecánica) y de la elastina (Manteca, 2013,p.16).

- Hipodermis:

Está compuesta por tejido conjuntivo laxo y por células sebáceas que tienen la función de brindar aislamiento térmico y actúa como reservorio metabólico. A esta capa de la piel por ser la más profunda las radiaciones UV no logran llegar, pero si puede sufrir daño como consecuencia del deterioro de las otras capas alterando su funcionalidad (Manteca, 2013,p.17).

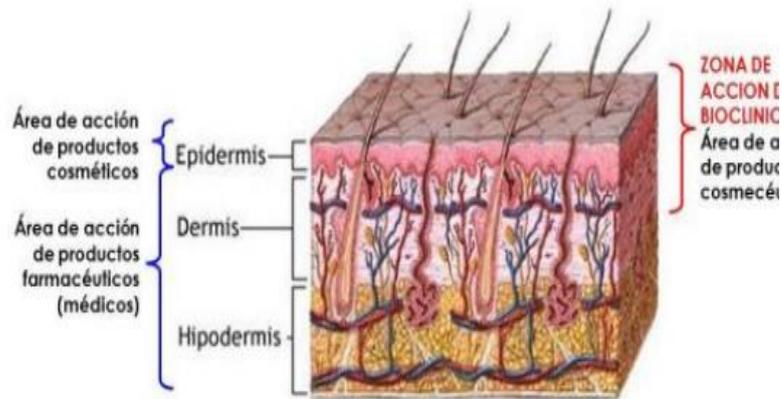


Figura 3-1. Principales capas de la piel

Fuente: (Manteca, 2013,p.8)

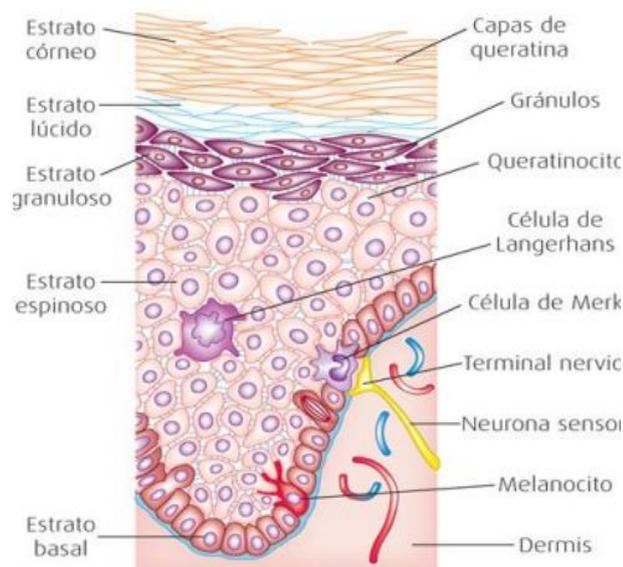


Figura 4-1. Capas de la epidermis

Fuente: (Sevilla, 2017,p.8)

Composición química de la piel:

- Agua: constituye aproximadamente el 70 y 80% de la piel, siendo el 15% el contenido intercelular de agua presente en la capa córnea e intracelular en las moléculas de la dermis, específicamente en el colágeno y elastina. Para que la piel se encuentre bien hidratada debe existir un equilibrio entre la difusión que consiste en el paso del agua desde la dermis hacia la epidermis y la evaporación a nivel de la superficie.
- Carbohidratos: principalmente la glucosa y ciertos glúcidos.
- Lípidos: compuesta por fosfolípidos, colesterol y otras sustancias que tienen la función de mantener la acidez de la piel, evitando la proliferación de microorganismos.
- Proteínas: constituyen una gran cantidad de aminoácidos que mantienen la estructura de la piel, entre ellos tenemos el colágeno y la elastina (Altamirano, 2015,p.7).

Funciones de la piel:

La principal función de la piel es que mantiene el medio interno estable, desempeña un papel de barrera de protección, evitando el ingreso de bacterias, hongos y virus, así como protege de posibles traumatismos y quemaduras. Se encarga de la regulación de la temperatura corporal conocida como termorregulación, que se alcanza cuando existe equilibrio entre la pérdida y ganancia de calor, para generar calor se produce vasoconstricción de los vasos sanguíneos de la piel y para perder calor se produce vasodilatación de los mismos y a través del sudor (Sanford y Gallo, 2013,p.371).

Otra función de gran importancia de la piel es que tiene la capacidad de proteger de los rayos ultravioletas emitidos por el sol, ya que en la piel se encuentra un pigmento llamado melanina que tiene la capacidad de absorber la radiación ultravioleta con longitudes de onda de 350 a 1200 nm y cromóforos que expulsan o dispersan las radiaciones, protegiendo de los daños que pueden originar la luz solar tras una exposición prolongada (Samaniego, et al, 2017,p.10).

La piel adquiere un proceso de adaptación frente a la radiación solar con el fin brindar protección a través de mecanismos naturales de fotoprotección. La pigmentación de la piel es el resultado de una exposición al sol, que se puede apreciar después de 2 a 3 días y se conoce como bronceado, el cual si es tomado adecuadamente es beneficioso para la piel ya que aumenta el Factor de protección solar FPS 2-3 (Samaniego, et al, 2017,p.8).

Se pueden distinguir dos tipos de bronceado, el primero que se produce a los 30 minutos de exponerse al sol y es responsable la radiación UV-A, donde la melanina existente en los melanocitos sufre un proceso de fotooxidación, por lo que la intensidad de color depende de la cantidad de melanina presente en la piel, este tipo de bronceado no brinda protección frente al eritema solar. Mientras que el segundo tipo de bronceado que aparece a los 2 a 3 días de la exposición solar, y es ocasionado por la radiación UV-B, se da por un proceso de melanogénesis o síntesis de nueva melanina, este tipo de bronceado si brinda protección a la piel frente a la quemadura solar, cuando su exposición al sol es moderada (Duro, et al, 2003,p.161).

La piel al ser la primera línea de defensa biológica del organismo brindándonos protección diaria contra el medio externo, se encuentra en un constante cambio, y uno de los factores de la piel que cambia con ello es el valor del pH, como un mecanismo de defensa para evitar el desarrollo y proliferación de microorganismos. Cuando el pH de la piel varía, se produce un cambio en la película hidrolipídica que es una emulsión compuesta por agua y lípidos que se encarga de cubrir toda la superficie de la piel y es el responsable de otorgar a la misma un pH ligeramente ácido de 5.5 (Chaparro, et al, 2015,p.7).

El valor de pH de la piel en la mujer es aproximadamente de 5.5 el cual tiende a variar debido a los cambios hormonales, mientras que el pH de la piel en los hombres es un poco más ácido aproximadamente de 5.0. Éstos valores depende de la región donde se localiza la piel, por ejemplo, el pH de la piel en la frente es de 5.4 y en la axila de 5.8, así también depende de la edad y de la raza (Lucero, 2017,p.13).

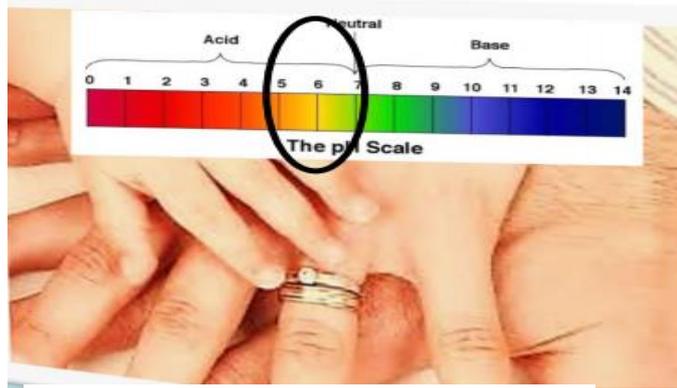


Figura 5-1. pH de la piel

Fuente: (Lucero, 2017,p.4)

Existen tres tipos de piel según las secreciones que se producen debido al manto hidrolipídico, que es una emulsión que contiene agua que procede de las glándulas sudoríparas y el medio ambiente, también lípidos. Actúa como una película cubriendo el estrato córneo y ayuda a un correcto mantenimiento de la función de barrera. Dependiendo de la fase continua de la emulsión, existen dos tipos de emulsiones en la piel la que es acuosa (w/o) y oleosa (o/w), como se muestra en la tabla 2-1 (Altamirano, 2015,pp.8-9).

Tabla 3-1. Tipos de piel según la secreción

	Piel seca	Piel normal	Piel grasa
Tipos de emulsión	o/w	o/w	w/o
Epidermis	Fina	Normal	Gruesa
Secreción sebácea	Escasa	Media	Alta
Tamaño de poro	Pequeño	Normal	Grande

Fuente: (Altamirano, 2015,p.9)

En América Latina el tipo de piel que prevalece en la población es la piel grasa seborreica (secreción sebácea y sudor en abundancia), se caracteriza por ser pieles muy protegidas y resistentes. Es por ello que, en el país como Ecuador debido a los cambios climáticos bruscos, la alimentación, sedentarismo y otros factores gran parte de la población presenta este tipo de piel (Altamirano, 2015,p.9).

1.4 Interacción de la radiación UV y la piel

Los tipos de radiaciones que interactúan con la piel son las radiaciones UV-A, UV-B y las radiaciones visibles a diferentes porcentajes, de las cuales el 5% se reflejan y las demás se absorben o se dispersan, ocasionando alteraciones en la fibra de colágeno y elastina, que son de gran importancia para mantener en buenas condiciones la estructura de la piel. Por lo que al verse deterioradas éstas dos fibras debido a una exposición muy prolongada a la luz solar, la piel tomará un aspecto menos joven (González, 2010,pp.4).

Esta interacción inicia al momento que la piel entra en contacto directo con la radiación UV, activando la piel inmediatamente un mecanismo de defensa endógeno, donde la melanina localizada en la epidermis tiene la capacidad de absorber las radiaciones UV y las devuelve hacia el exterior en forma de calor o tiende a dispersarlas ya que es capaz también de realizar un proceso de oxido-reducción (González, 2010,p.4).

Y como segundo mecanismo endógeno de la piel es la activación de moléculas electromagnéticas estructuradas como el DNA nuclear, tiroxina, el ácido urocánico, triptófano, conocidos como cromóforos, que tienen la capacidad de absorber los fotones UV e imparten gran cantidad de energía a los electrones de dichas moléculas y hacen reciclar a la radiación UV. El ácido urocánico que es un cromóforo que se genera de la histidina epidérmica, desempeña la función fotoprotectora ya que impide que se produzca la conversión de la energía solar capturada en energía térmica, que produce la quemadura solar en la piel, proceso que se lleva a cabo en la piel cuando la radiación UV es menor a los 315 nm de longitud de onda. Cuando la longitud de onda es mayor los cromóforos envían estas radiaciones hacia la dermis y se eliminan hacia el entorno, a través de la hemoglobina, bilirrubina y otras sustancias que se producen en la elastina y el colágeno gracias al DNA celular de la piel (González, 2010,p.4-5)(Samaniego, et al, 2017,pp.5-6).

Sin embargo, cuando la exposición al sol se lo realiza por mucho tiempo, el mecanismo endógeno de la piel no es capaz de proteger contra la radiación UV, por lo que se produce varias alteraciones de la piel, una de ellas y la más frecuente es la quemadura solar que puede avanzar hasta generar cáncer de piel (Samaniego, et al, 2017,p.23).



Figura 6-1. Espectro de la radiación solar

Fuente: (Manteca, 2013,p.26)

1.5 Foto-envejecimiento cutáneo prematuro

Es la degeneración de la piel ocasionada por la exposición crónica a las radiaciones UV, especialmente las UV-A ya que se absorbe en las capas más profundas de la piel y es capaz de interactuar con los cromóforos endógenos generando ROS provocando daño fotooxidativo e incluso puede provocar un daño irreversible en el ADN dando lugar al desarrollo de cáncer de piel (Villegas *et al.*, 2005,p.19).

La exposición crónica al sol produce daños en el tejido conectivo el cual contiene colágeno, mediante la inhibición o reducción de la síntesis del procolágeno en la piel. Esta inhibición se da por el factor Cjun que es emitido por la radiación UV ocasionando la transcripción del procolágeno y la degradación de la enzima metaloproteinasa y de esta manera que produce el daño en el tejido conectivo lo que conlleva a la desorganización de la elastina y del colágeno dando lugar a la elastosis, sequedad de la piel, flacidez y arrugas bien definidas (Villegas *et al.*, 2005,p.19).

Es importante mencionar que el envejecimiento de la piel por el paso de los años es muy diferente al envejecimiento prematuro, el primero comienza a aparecer entre los 30 a 35 años de edad perdiendo poco a poco su elasticidad y tomando la apariencia de una piel flácida y delgada, debido a la disminución de los vasos sanguíneos, grasa, colágeno y elastina, considerado un proceso normal de la vida de los seres humanos.

El fotoenvejecimiento ocasionado por la radiación UV se puede agrupar en:

- Cambios en la textura de la piel: la piel se engrosa, es delgada y presenta arrugas.
- Cambios vasculares: formación de eritema (fototipo I y II),
- Cambios en la pigmentación: formación de pecas, manchas oscuras o claras, pigmentación irregular.
- Cambios papulares: formación de nevus (lunares), queratosis seborreica y comedones (Martínez, 2000,p.4).

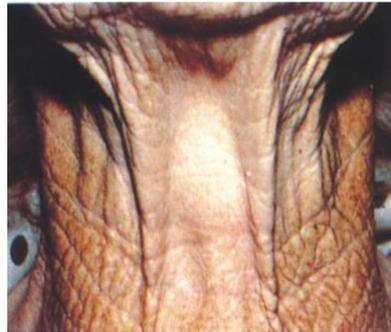


Figura 7-1. Fotoenvejecimiento prematuro de la piel

Fuente: (Martínez, 2000,p.4)

1.6 Quemadura solar

Conocida también como dermatitis solar o eritema solar, es el daño en la piel normal causado por la exposición al sol sin utilizar medidas de protección, se manifiesta a unas pocas horas de exposición como una respuesta inflamatoria en la piel, donde primero se produce la formación de un eritema (enrojecimiento de la piel por el aumento de flujo sanguíneo en los capilares), seguido de edema y por último la formación de ampollas. Cuando la exposición al sol fue por un tiempo muy prolongado, la piel puede desarrollar quemaduras de primer o segundo grado, las cuales necesitan de un médico especialista para su debido tratamiento (Duro, et al,2003,p.40).

Las quemaduras solares aparecen como mecanismo de defensa biológica de la piel frente a las radiaciones UV especialmente las UV-B, la lesión se produce en las células queratinocitos, la cual el grado de quemadura solar depende especialmente del tipo de piel de las personas, así como el tiempo de exposición y las condiciones climáticas. A través de esta reacción inflamatoria en la piel crearon un sistema de medida de los cambios biológicos que puede sufrir la piel frente a la radiación solar, el cual se lo conoce como dosis eritematosa mínima (DEM),

que se refiere a la dosis mínima de exposición a un tipo de banda de luz que ocasiona eritema solar en la piel, se expresa como energía (Joule) por superficie (cm^2), por lo que para generar un mínimo eritema en la piel se necesita dosis mínimas de 20-70 mJ/cm^2 . Dosis eritematosas muy altas puede conllevar a originar cáncer de piel (Zaragozano, et al, 2016,p.49).

Tabla 4-1. Fototipos de piel y respuesta biológica frente a la exposición solar

Fototipos	Color	DEM (minutos)	Historia de quemadura o bronceado
I	Blanco	15-30	Siempre se quema, nunca se broncea
II	Blanco	25-40	Siempre se quema, se broncea con dificultad
III	Blanco	30-50	Se quema poco, se broncea gradualmente
IV	Café claro	40-60	Se quema poco, siempre se broncea bien
V	Moreno	60-90	Casi nunca se quema, se broncea profusamente
VI	Negro	90-150	Nunca se quema, siempre se broncea intensamente

Fuente: (Martínez, 2000,p.4)



Figura 8-1. Quemadura solar en la piel.

Fuente: (Martínez, 2000,p.3)

1.7 Fotocarcinogénesis

Los seres humanos al someterse a una excesiva exposición a la radiación UV, conllevan a la inestabilidad de los mecanismos biológicos de fotoprotección y como consecuencia promueven a la proliferación anormal de las células que presentan daño en su DNA. La exposición prolongada a la radiación UV-B produce daño directo en el ADN celular de la piel, mientras que frente a la exposición UV-A el daño celular es indirecto, debido a que se encuentra mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables de la formación de productos oxidativos, por lo que si la lesión celular se produce en varios genes que se encuentran implicados en

desarrollo, proliferación o la supresión tumoral, la célula tiene que realizar inmediatamente el trabajo de reparación. Una reparación incompleta del DNA, así como la eliminación de los foto-productos mutágenos provocan la proliferación descontrolada de las células, conduciendo de esta manera a la formación de cáncer de piel melanoma (derivan de los melanocitos) y no melanoma (células que derivan de la epidermis), éstos dos tipos representan el 95% de cáncer de piel, que se han convertido en un gran problema de salud debido a su incremento acelerado en éstos últimos años, por lo que se considera la segunda causa de muerte en el país (Samaniego, et al, 2017,p.10).

Tabla 5-1. Tasa de incidencia de cáncer cutáneo en Quito-Ecuador

Edad	Femenino	Masculino
60-64	9.3	11.8
65-69	12.8	16.8
70-74	25.1	36.4
>75	31.7	41.1

Fuente: (Arteaga and Pazmiño, 2013, citados en SOLCA 2006-2010,P33)

El cáncer de piel se clasifica en dos tipos según las células afectadas, como:

- Cáncer de piel melanoma

Tumor maligno que se produce en los melanocitos, los cuales sufren alteraciones malignas dando origen a mutaciones genéticas ocasionando que las células realicen sus funciones biológicas de manera anormal, por ejemplo, pueden producir pigmento en gran cantidad o ya no tienen la capacidad de producir pigmento, debido a que ya no se sintetiza la melanina. SOLCA en el año 2010 registró una tasa de incidencia del 38, 2% de cáncer de piel melanoma, siendo el más frecuente que los demás tipos de cáncer de piel (Craythorne y Al-Niami, 2017,p.3).

Las principales causas para originar cáncer de melanoma se deben al fototipo de piel de las personas siendo el fototipo I y II, que se ha visto afectado en mayor frecuencia en la población, otra causa es la exposición al sol en un tiempo muy prolongado y sin usar medidas de protección adecuadas, por la aparición de nevus melanocíticos (llamadas también pecas que son lesiones benignas de los melanocitos) y por causas genéticas. Para su detección temprana se debe realizar una autoinspección temprana aplicando el método ABCDEF, que consiste en observar minuciosamente al nevus melanocítico: si existe asimetría, irregularidad de los bordes, cambio de color o si hay poca pigmentación, varios colores o un color azul negruzco, crecimiento del nevus, morfología extraña. Si existe alguna de éstas anomalías es necesario que acuda inmediatamente

donde un médico especialista para confirmar o descartar posibles sospechas de cáncer de piel melanoma (Craythorne y Al-Niami, 2017,p3).

- Cáncer de piel no melanoma

SOLCA en el año 2010 registró un 19% de incidencia de cáncer de piel no melanoma en Ecuador-Quito. Dentro de este tipo de cáncer existen dos tipos que reciben el nombre según las células afectadas, que son:

El primero es el cáncer de piel de células basales (BCC) es el más frecuente y afecta principalmente a personas adultas de 40-45 años de edad, es una neoplasia del epitelio que surge en las células germinativas, son consideradas como poco malignas, se debe a la exposición aguda a la radiación solar UV-B. El segundo tipo es el cáncer de piel de células escamosas (SCC) es una neoplasia maligna que se origina en las células epidérmicas específicamente en los queratinocitos, afecta principalmente a las personas adultas de la tercera edad (80-85 años), es menos frecuente que la BCC, los factores que ocasionan este tipo de cáncer se deben a una exposición de la radiación UV-B crónica (Craythorne y Al-Niami, 2017,p.2-3).

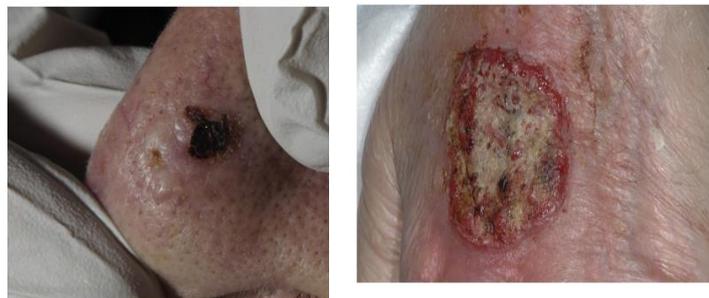


Figura 9-1. Cáncer de piel de células basales (BCC). Izquierda. Cáncer de piel de células escamosas. Derecha

Fuente: (Craythorne y Al-Niami, 2017,p.2)

1.8 Fotoprotección

Es una medida profiláctica contra los efectos perjudiciales de la radiación UV sobre la piel, para ello consiste en una serie de mecanismos que los seres humanos utilizan para evitar que la radiación solar llegue de manera directa a la piel y cause daño, para ello no se debe exponerse al sol de las 12 y 4 de la tarde, evitar el uso de las cámaras bronceadoras, usar ropa adecuada, gafas de sol y sombreros. Así también el uso de protectores solares, que están compuestas por sustancias

que tienen la capacidad de disminuir o detener la radiación UV en la piel. Existen tres tipos de fotoprotectores que son los físicos, químicos y biológicos que más adelante se describirá a detalle (Tapia, 2018,p.2812).

De esta manera se previene el envejecimiento prematuro de la piel, la disminución de reacciones fotoquímicas en la piel y la formación de las especies reactivas conocidas como ROS y también se logra evitar que se produzcan daños en el DNA y mutaciones en las células de la piel (Martínez, 2000,p.5).

1.8.1 Factor de Protección Solar (FPS)

Índice que determina la capacidad que tiene una sustancia para brindar protección contra las quemaduras solares, inducida principalmente por la radiación UV-B. Éste índice se obtiene mediante el cociente de relación entre la dosis eritematosa en la piel que es protegida por un filtro solar y la dosis eritematosa en la piel que no fue protegida por ningún filtro solar (López, 2012,p.53).

La FDA (Food and Drugs) en una de sus publicaciones sobre los protectores solares establece que es permitido la comercialización de protectores solares con un valor de FPS igual o mayor a15, ya que aún pueden reducir el riesgo de cáncer de piel, así como foto-envejecimiento cutáneo. La formulación de protectores solares debe contener diferentes sustancias de tipo orgánicas e inorgánicas con el fin de asegurar una buena fotoprotección, efectos secundarios mínimos y una buena aceptabilidad (Cestari, et al, 2012,citados de FDA, 2012,pp.136-137).

Tabla 6-1. FPS según los tipos de piel y el UVI

Nivel de radiación (UVI)	Piel clara		Piel oscura	
	Exposición máx. sin protección (minutos)	Índice de protección indicado (FPS)	Exposición máx. sin protección (minutos)	Índice de protección indicado (FPS)
0-2 (bajo)	80	15	110	8
3-5 (moderado)	40	25	60	15
6-7 (alto)	25	30	35	25
8-10 (muy alto) verano	20	50+	30	30
11+ (extremo) verano	15	50+	25	50+

Fuente: (COLIPA, 2011)

Parámetros de evaluación del Factor de Protección Solar (FPS):

- Eficacia: un protector solar debe tener un amplio espectro alcanza una longitud de onda mayor a los 370 nm y el FPS contra la radiación UV debe ser mayor o igual a 15.
- Seguridad: a través de pruebas *in vitro* se debe garantizar que el protector solar una vez aplicado en la piel de los seres humanos no cause irritación, penetración dérmica, sensibilidad o déficit de vitamina D.
- Sustantividad: se considera a un protector solar resistente al agua cuando después de dos inmersiones de 20 minutos, sea capaz de mantener aún el FPS establecido (FDA, 2012).

1.8.2 Protector solar

Son sustancias (tipo crema, loción, gel, spray) de tipo orgánicas (químicos), inorgánicas (físicos) y biológicas, que una vez aplicadas sobre la piel tienen la capacidad de absorber, dispersar o reflejar los rayos UV de la piel. La reflexión y la dispersión de la radiación UV representan el 10% de la fotoprotección, por lo que el 90% de la capacidad fotoprotectora de los protectores solares comerciales lo hacen a través de la absorción, donde el fotón UV una vez absorbido, la energía se libera como fluorescencia, fosforescencia, calor, vibración, transferencia de energía a otra molécula o mediante fotorreacción antes de aceptar a otro fotón. Es así que cuando más rápido es la velocidad de retorno al estado original, más potente será el filtro solar para los protectores solares, considerando como un protector solar aquellos que tienen la capacidad de brindar protección contra la radiación UV-A y UV-B y eliminar los radicales libres (Al-Jamal, et al, 2014,p.220).

Todas aquellas sustancias o compuestos activos que presenten actividad fotoprotectora se denominan filtros solares que pueden ser físicos o químicos (Arteaga and Pazmiño, 2013,p.48).

- Filtro solar químico

Son moléculas orgánicas solubles en agua, que en su estructura presentan grupos cromóforos que tienen la capacidad de absorber la radiación solar y dispersarla como radiación térmica, y de esta manera evita que las radiaciones UV se absorban por los componentes biológicos de la piel como los ácidos nucleicos y las proteínas. Este tipo de filtro solar puede absorber tanto las radiaciones UV-B (gran cantidad) y UV-A (menor cantidad). Las benzofenonas, cinamatos, salicilatos, dibenzoil metanos, PABA, entre otros son sustancias químicas permitidas por la FDA para la utilización en la formulación de un protector solar (Arteaga and Pazmiño, 2013,p.50)

Uno de los inconvenientes de los filtros UV químicos es que son inestables ocasionando la formación de fotoproductos alterando su espectro de absorbancia y reduciendo de esta manera su

efecto fotoprotector. Así también varios científicos a través de estudios investigativos identificaron que los productos de fotólisis de algunos de estos filtros han originado en las personas dermatitis fotoalérgica, es así que la FDA en 1993 retiró del mercado la sustancia química benzofenona-3 y el isopropil-dibenzoilmetano debido al problema mencionada anteriormente, así también algunos compuestos químicos tienen la capacidad de penetrar las capas de la piel hasta llegar al torrente sanguíneo, lo cual hace que su efecto fotoprotector disminuya y también puede producir efectos tóxicos locales o sistémicos (Giraldo, et al, 2014,p.73-274).

- Filtro solar físico

Son moléculas inorgánicas insolubles en agua que tienen la capacidad de reflejar la radiación solar, actuando como una pantalla en la piel, de esta manera evita que se produzca daños en la piel como la formación de eritema o bronceado. Presentan un espectro de absorción de las radiaciones UV-A y UV-B, visible e infrarrojo, su poca aceptabilidad por las personas se debía a que formaban una máscara evidente en el rostro debido al tamaño de las partículas de este tipo de sustancias, pero en la actualidad gracias a que han mejorado su apariencia cosmética ya es aceptado por la población. Dentro de este grupo tenemos al dióxido de titanio (TiO₂) y el óxido de zinc (ZnO), sustancias que fueron aprobadas por la FDA para su uso, son estables a la luz, no producen ningún tipo de alergia en la piel, pueden brindar protección hasta una longitud de onda de 380 nm (Altamirano, 2015,p.26).

La eficacia de los protectores solares tanto físicos como químicos no solo depende de su composición o de su Factor de protección solar (FPS), sino que también depende de su correcta aplicación. Para ello debe ser aplicado sobre la piel 30 minutos antes de exponerse al sol, debe formar una capa gruesa cubriendo toda el área de la piel de manera homogénea, su aplicación debe ser repetitiva mínimo cada dos horas de exposición solar, especialmente después del baño o sudoración (Carralero, 2004,p.53-54).

Tabla 7-1. Sustancias de protección solar permitidos en Europa (CE) y EE. UU (FDA)

Tipo de compuesto	Absorción		
	UVB (290-320)	UVA2 (320-340)	UVA1 (340-400)
<i>Químico u orgánico</i>			
Derivados del ácido paraaminobenzoico	**		
Ácido paraaminobenzoico	**		
Padimato O			
Cinamatos			
Octinoxato o Parsol MCX	**		
Cinoxato	**		
Salicilatos			
Octisalato	**		
Homosalato	**		
Salicilato de trotamina	**		
Benzofenonas			
Oxibenzona	**	**	
Sulisobenzona		**	*
Dioxibenzona	**	*	
Otros			
Octocrileno	**		
Ensulizol	**		
Avobenzona o Parsol 1789		**	**
Meradimato		**	
Mexoryl XL		**	**
Tinosorb M	**	**	**
Tinosorb S	**	**	**
<i>Físico o inorgánico</i>			
Dióxido de titanio	**	**	**
Óxido de cinc	**	**	**

** Buena protección; * Protección regular.

Fuente:(Saéz and Orozco, 2014,p.365)

Tabla 8-1. Características de los filtros químicos y físicos.

	PANTALLA FÍSICA	FILTRO QUÍMICO
Origen	Inorgánico	Orgánico
Solubilidad	Insoluble	Soluble
Mecanismo	Reflexión	Absorción
Espectro absorción	Amplio	Estrecho
Fotoestabilidad	100%	Variable
Toxicología	Inocuidad	Riesgos
Cualidades cosméticas	Bajas	Buenas

Fuente:(Esteva, 2005,p.70)

- Filtros solares biológicos

Son sustancias antioxidantes que estimulan al sistema inmune cutáneo para crear una barrera de defensa interna contra las radiaciones UV y de esta manera evitan la formación de radicales libres, es por ello que se los conoce como inmunoprotectores solares. Estos protectores solares protegen la piel contra la luz solar sin ser filtros solares, ya que no tienen la capacidad de absorber o reflejar las radiaciones UV. Los protectores solares biológicos se utilizan como complemento de los filtros solares físicos y químicos, pero no pueden sustituirlos en las formulaciones cosméticas. A

excepción de que los principios activos sean de origen vegetal que en la actualidad las Industrias cosméticas están mostrando interés por este tipo de formulaciones (Altamirano, 2015,p.27).

Tabla 9-1. Principales filtros biológicos

Filtros biológicos	Acción
Tocofenil acetato	Antioxidante
Retinil palmitato	Antioxidante
Pantenol	Antioxidante
Ácido ascórbico	Antioxidante
Zinc	Antioxidante
Magnesio	Antioxidante

Fuente: (Altamirano, 2015,p.27)

1.9 Componentes de fotoprotectores que causan problemas de salud

Los cosméticos que desde varios años se encuentra en constantes investigaciones debido a que algunos componentes pueden causar algún efecto nocivo en la piel de las personas (Laguna et al. 2009,p.56).

Mediante la base de datos de la Unidad de Alergia Cutáneo del Servicio de Dermatología identificaron que los conservantes son los principales alérgenos responsables de desarrollar una dermatitis alérgica de contacto (DAC), como la mezcla de parabenos y el formaldehído, siendo este último el más frecuente sensibilizante por lo que su uso ha sido limitado. El Euxyl K-40 que está conformado por dos ingredientes activos que son: el fenoxietanol y el dibromodicianobutano, este último es el componente químico responsable de la sensibilización alérgica de este conservante (Laguna et al. 2009,p.57).

Algunos filtros solares químicos son la causa principal de desarrollar dermatitis fotoalérgica, debido a que en su formulación contienen sustancias químicas que son foto-inestables que al encontrarse en contacto íntimo con la piel por tiempos prolongados ayuda a la sensibilización alérgica (Laguna et al. 2009,p57).

Los principales alérgenos presentes en algunos filtros solares químicos son:

- Ácido para-aminobenzoico (PABA)
- Etilhexil-p-metoxicinamato

- Metilbencilideno alcanfor
- Hidroxi-4-metoxibenzofenona
- Butil-metoxidibenzoilmetano
- Isoamil-metoxicinamato (Laguna et al. 2009,p.57-58).

Mediante estudios *in vitro* identificaron que existen compuesto químicos como: metilantranilato, metil-2-aminobenzoato, 4-metoxiisoamilcinamato que a más de ocasionar dermatitis foto alérgica producen fototoxicidad, debido a son capaces de dar lugar a la formación de radicales libres intermediarios (Alcalde, 2008,p.16).

1.10 Fitocosméticos

Estudio de materias primas de origen vegetal, llamados fitoingredientes que son utilizados para las formulaciones de diferentes productos cosméticos, de higiene o de tocador, que tienen la capacidad de ejercer una función cosmética o terapéutica. No existe una norma, pero a través de estudio han establecido que para poder considerar a un producto como fitocosmético la concentración debe ser significativa para que la función cosmética destinada se ejerza de manera óptima (Kiellhofner, 2011,p.5).

1.10.1 Fitoingredientes cosméticos

Es cualquier materia prima de origen vegetal o natural que ha sido sometida a varios estudios para identificar aquellos metabolitos secundarios con actividad terapéutica y que han sido procesados de manera adecuada para ser incluidos en las formulaciones cosméticas deseadas. Los fitoingredientes son de composición heterogénea y pueden proceder de plantas frescas o secas, trituradas o enteras, como extractos, aceites o pueden ser aislados aquellos metabolitos secundarios de interés a través de métodos específicos (Kiellhofner, 2011,p.6).

- **Cosmético natural**

La Norma Ecocert de Cosméticos Naturales y Ecológicos es un organismo que se encarga de desarrollar operaciones de control y de certificación de 85 países del mundo, con la finalidad de garantizar la seguridad y respeto del medio ambiente en todo el proceso de elaboración de productos cosméticos, así como su distribución (Alcalde, 2008,p.98).

Ecocert define como cosmético natural a todo producto cosmético que contenga como mínimo el 95% del total ingredientes de origen natural incluyendo al agua, como máximo debe contener un 5% de sustancias sintéticas, como por ejemplo los conservantes y 5% como mínimo de ingredientes derivados de la agricultura biológica, este último representa el 50% como mínimo de ingredientes vegetales (Ecocert, 2012).

Existen varios tipos de cosméticos naturales como:

- Sustancias naturales: fitoingredientes, derivados de animales y de minerales.
- Sustancias casi naturales: glicerina y derivados, hidrolizados de proteínas, ceras, ácidos grasos, ésteres, entre otras.
- Sustancias símil naturales: conservadores y colorantes, son ingredientes sintéticos pero la ventaja es que son idénticos a los que se encuentran en la naturaleza. Deben ser elaborados por proceso permitidos y que no procedan de modificaciones genéticas (Kiehlhofner, 2011,p.7).

- **Clasificación por su funcionalidad cosmética**

Permite la selección de fitoingredientes para la utilización en la formulación de un producto cosmético para fines específicos, como, por ejemplo:

- Antibacteriana: previene o evita la proliferación de microorganismos. Ejemplo: lavanda, clavo.
- Astringente: contrae o disminuye el tamaño de los poros. Ejemplo: geranio, ciprés.
- Antioxidante: evita el proceso de oxidación en la cadena oxidativa. Ejemplo: té verde, romero.
- Anti transparente: en la zona aplicada reduce la cantidad de sudor que se produce en las glándulas sudoríparas. Ejemplo: ciprés, salvia.
- Desodorante: inhibe el desarrollo bacteriano en la zona aplicada, de esta manera neutraliza olores desagradables del cuerpo. Ejemplo: anís, té verde.
- Fotoprotector: Absorbe o desvía la radiación UV, protegiendo de posibles lesiones en la piel. Ejemplo: *Zea mays*, *Bidens andicola*, *Matricaria*.
- Regulador del sebo: actúa en las glándulas sebáceas reduciendo la producción de sebo. Ejemplo: *Melaleuca*.
- Tónico: dilata los vasos dérmicos, otorgando a la piel un aspecto turgente. Ejemplo: ginseng, guaraná.
- Suavizante: reduce la inflamación de la piel, y otorga un buen aspecto. Ejemplo: *Caléndula*.

- Emoliente/hidratante: retiene la humectación natural de la piel. Ejemplo: Aloe vera, ginseng.
- Exfoliante: ayuda a la descamación de la capa córnea para la regeneración de la piel. Ejemplo: *Salix*, *Citrus*.
- Lubricante: ejerce su acción sobre la epidermis, otorgándole mayor elasticidad. Ejemplo: aceite de coco, aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de almendras, aceite de soya.
- Anticelulítico: mejora el aspecto de la piel, la cual se ve deteriorada por el efecto de las celulitis. Ejemplo: *Equisetum* (Kiehlhofner, 2011,p.13).

- **Clasificación por grupos fitoquímicos**

Los fitoingredientes cosméticos constituyen una mezcla de varios compuestos, con actividad cosmética, la cual se determina según la concentración y el tipo de interacción que ejerzan, de esta manera pueden producir un efecto sinérgico, antagonista o potenciador. Estos efectos dependen del tipo de formulación y de la forma cosmética que se le otorgue al producto cosmético. La mayoría de las formulaciones presentan varios grupos de fitoingredientes, que a través de estudios etnobotánicos, farmacológicos, toxicológicos ayudan a predecir el tipo de utilidad ideal ya sea como de utilidad dermatológica o cosmética (Kiehlhofner, 2011,pp.13-14).

Grupos de fitoingredientes más utilizados en fitocosmética:

- Lípidos
- Hidratos de carbono
- Saponinas
- Aceites esenciales
- Polifenoles: flavonoides, cumarinas, taninos, etc.
- Ácidos orgánicos
- Aminoácidos y péptidos
- Vitaminas (Kiehlhofner, 2011,p.14).

1.11 *Bidens andicola*



Figura 10-1. *Bidens andicola*

Fuente: (López , 2016,p.6)

1.11.1 Clasificación científica

Tabla 10-1. Clasificación científica de *Bidens andicola*

Reino: Plantae	Familia: Asteraceae
División: Magnoliophyta	Subfamilia: Asteroideae
Clase: Magnoliopsida	Género: Bidens
Orden: Asteroideae	Especie: andicola
Tribu: Coreopsidae	Autor epitelio específico: Kunth

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Fuente: (López, 2016,p.5)

1.11.2 Descripción botánica

Es una especie nativa vegetal, comúnmente conocida como ñachag, ñachak sisa, ñachi o flor de ñachag, pertenece a la familia de Asteraceae, mide aproximadamente 30 cm de alto, su inflorescencia es de 5 cm de diámetro y su florecimiento se da en los meses de octubre a julio. Es

una hierba perenne andina que crece de manera espontánea en gran cantidad por los campos, se localiza a latitudes de 2500 - 4500 msnm. Presenta un tallo delgado y ramificado, tiene hojas opuestas y las flores son marginales y de color amarillo-naranja y sus estambres tienen las anteras unidas (Vinueza *et al.*, 2017,p.160).

1.11.3 Usos terapéuticos

Bidens anicola como medicina tradicional por varios años ha sido utilizada especialmente por las comunidades indígenas ecuatorianas como antiinfeccioso, diurético, astringente, antiinflamatorio, antipirético, para tratar las infecciones urinarias, cálculos renales, protector hepático, cistitis, prostatitis y laringitis. También como colorante, tónico, antigripal, refrescante y las hojas lo utilizan por vial oral mediante decocción como anticonceptivos y de manera tópica como antiirreumático (Tommasi,et al, 1998,973) (Vinueza *et al.*, 2017,p.160).

1.11.4 Composición, principios activos y actividad farmacológica

Estudios realizados mediante tamizaje fitoquímico y pruebas específicas sobre la composición química de *Bidens andicola*, han logrado la identificación de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, metabolito secundario que le otorga la actividad fotoprotectora, también contiene quercetina principalmente de tipo glucósido, compuestos derivados de la quercetina 3-O-metil-éter (actúa como antioxidante, anticancerígeno y antiinflamatorio), también aislaron de las partes aéreas de *B.andicola*. el compuesto glucósido de éster chalcona (Tommasi, et al, 1998,p.973) (Vinueza *et al.*, 2017,p.160).

1.12 Mecanismos de fotoprotección en plantas

La emisión de radiación solar en las plantas, también puede producir efectos beneficiosos o perjudiciales como en los seres humanos. Es por ello que las condiciones ambientales como la radiación solar, temperatura, humedad, sequía, entre otros, tienen una gran implicación en la estructura y función de las plantas. Cuando las plantas se ven amenazadas por condiciones de estrés, activan inmediatamente mecanismos de defensa con fin de mantener estable la homeostasis.

1.12.1 Agentes antioxidantes

Una intensa exposición a la radiación UV produce daño en el DNA, oxidación de las proteínas y con ello induce a la síntesis de metaloproteinasas (MMP). Por lo que los antioxidantes vegetales sirven como complemento para reforzar la actividad fotoprotectora, debido a que estas sustancias vegetales disminuyen el daño ocasionado por la radiación solar sin interferir o alterar la síntesis de vitamina D en la piel, así también éstas sustancias tienen capacidad fotoprotectora. Los antioxidantes vegetales que con mayor frecuencia son utilizados en la formulación de los protectores solares son: β -caroteno, vitamina C y la vitamina E (Gilaberte and González, 2010,p.661).

- Carotenoides

Antioxidante como la luteína que es un pigmento amarillo y la astaxantina pigmento de color rojo, pertenecientes a la familia de los carotenoides que se encuentran en los vegetales tienen la capacidad de eliminar los radicales peroxilipídicos, al inhibir las poliaminas libres que se generan por la radiación UV-A (Gilaberte and González, 2010,p.661).

- Polifenoles

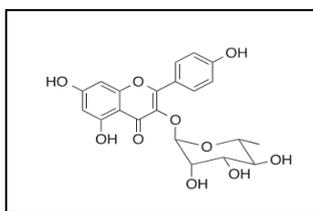


Figura 11-1. Estructura de un polifenol

Fuente: (Mansur *et al.*, 2016,p.2)

Son sustancias químicas que se encuentran en la mayoría de las plantas como metabolitos secundarios, se caracterizan por contener un grupo fenol en su molécula y por su actividad fotoprotectora. Se subdividen en dos grupos: taninos hidrolizables y fenilpropanoides, dentro de este segundo grupo se encuentran los flavonoides que son pigmentos naturales que se encuentran en las plantas, frutas y verduras que tienen la capacidad de proteger contra agentes oxidantes producidos por la radiación UV y por otros factores ambientales. Debido a que los seres humanos no podemos sintetizar en nuestro organismo estos metabolitos secundarios es necesario incluirlo en la dieta alimenticia o en productos fitocosméticos (Mansur *et al.*, 2016,p.2).

Los flavonoides son los metabolitos secundarios de gran interés en las Industrias Cosméticas por su actividad fotoprotectora, derivan de la familia de los polifenoles y son sintetizados por las

plantas mediante una vía metabólica llamada fenilpropanoides. Su estructura química se caracteriza por contener una variable número de grupos hidroxilos fenólicos. Desde el punto de vista de sus propiedades tienen la capacidad fotoprotectora, antioxidante a través de la quelación del hierro y otros metales de transición, protegiendo de esta manera de daños oxidativos, también presenta efectos de gran interés para tratar varias patologías como cardiopatías, aterosclerosis, entre otras. En función de su estructura que clasifican en: flavanos (catequina), flavonoles (quercetina), flavonas (diosmetina) y en antocianidinas. En la actualidad han identificado más de 5.000 tipos de flavonoides (Mansur *et al.*, 2016,pp.2-3).

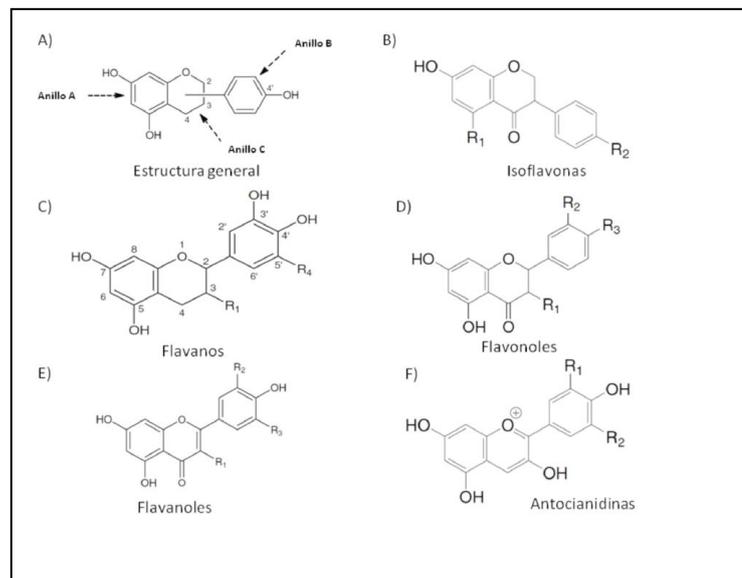


Figura 12-1. Estructura química y tipos de flavonoides

Fuente: (Costa *et al.*, 2015,p.413)

Los flavonoides son pigmentos no fotosintéticos debido a sus efectos de fotoprotección que presentan en las plantas, por lo que actúan como filtros solares, que a través de estudios han identificado que este tipo de metabolitos secundarios, así como son capaces de proteger a las células de las plantas también son capaces de brindar protección a las células de la piel de los seres humanos (Giraldo, et al, 2014,p.274).

Su actividad fotoprotectora se da por la concentración de electrones deslocalizados que posee en los anillos bencénicos de su estructura química, facilitando de esta manera el traslado de la energía. Los anillos bencénicos absorben la radiación UV-B, la cual es altamente energética y es la responsable de la formación de radicales libres (Soares, et al, 2009,p.283).

1.13 Emulsiones

Sistema de dispersión heterogéneo, donde un líquido (fase continua) se dispersa en otro líquido de diferente naturaleza por lo que son inmiscibles, por lo que para su estabilización es necesario añadir un emulgente adecuado, presenta dos fases inmiscibles, una interna que puede ser agua y otra externa que puede ser aceite o viceversa las cuales son líquidas (Olmos, 2017,p.1).

1.13.1 Componentes de la crema fotoprotectora

- Principio activo

Su efectividad depende de la capacidad de absorción percutánea, es decir la capacidad de penetración que tenga la sustancia en la piel, la cual no depende solo de las características físicas y químicas del principio activo sino también del vehículo, excipientes utilizados y el fototipo de piel. Aquellos excipientes utilizados en las formulaciones de protectores solares deben cumplir con las siguientes características: debe tener alta especificidad, al absorberse en a la piel no debe aumentar sus efectos sistémicos no deseados y que cuando se desea que el principio activo se absorba debe tener la capacidad de liberarse del vehículo fácilmente. Se pueden utilizar principios activos con actividad fotoprotectora químico, físicos o biológicos, dentro de este último grupo se encuentran los metabolitos secundarios con actividad fotoprotectora derivados de algunas plantas. Ejemplo: *Bidens anidcola* (Ñachag), *Zea mays* (Maíz) entre otros (Altamirano, 2015,p.34).

- Vehículo

Tenemos los de naturaleza hidrofílica: el agua destilada que es considerado como el disolvente universal y de naturaleza lipofílica: hidrocarburos oleosos y ceras. Para elegir el tipo de vehículo se debe tener en cuenta las características generales y específicas.

Tabla 11-1. Características generales y específicas para la selección del vehículo

Características generales	Características específicas
pH próximo al de la piel (5-5,5).	Miscible con la capa epicutánea de la piel.
Buenas propiedades reológicas.	Buen poder absorbente.
Fácil de eliminar.	Alto Factor de Protección Solar
No deben manchar ni la piel, ni los tejidos.	Posibilidad de resistir la esterilización.
No debe irritar ni sensibilizar la piel.	Buena capacidad de ceder el principio activo.
Buena estabilidad física, química y microbiológica.	Compatible con los excipientes y que no genere reacciones indeseables.

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Fuente: (Altamirano, 2015,p.34)

- Ceras:

Tienen la capacidad de aumentar la viscosidad de la formulación de la crema y producen un efecto oclusivo sin producir un aumento de la sensación de tacto graso y adhesividad; además mejoran la extensibilidad de la crema. Ejemplo: cera blanca y el aceite de jojoba (Olmos, 2017,p.2).

- Aceites vegetales:

Contienen polifenoles por lo que actúan como antioxidantes evitando la formación de radicales libres y de esta manera protege de los daños producidos por la oxidación, además son emolientes y aumentan la sustantividad de las fórmulas y mejora la extensibilidad. El contenido de los polifenoles varía dependiendo del tipo de aceite, siendo el aceite de oliva el que posee una cantidad significativa de estos compuestos (Moudache *et al.*, 2016,p19).

- El aceite de oliva es rico en ácidos grasos moninsaturados

Mediante estudios realizados con el extracto de la hoja de olivo, científicos lograron identificar 28 tipos de compuestos fenólicos, entre ellos tenemos: flavonoides, secoiridoides, triterpenos, fenoles sustituido. Éstos compuestos le otorgan a la planta de olivo como la capacidad fotoprotectora y antioxidante, siendo de gran interés a nivel de las Industrias cosméticas y de alimentos (Moudache *et al.*, 2016,p.18).

- Alcoholes grasos o alcoholes céreos:

Se utilizan en para aumentar la viscosidad de las emulsiones, tienen propiedades emolientes, son oclusivos y coemulgentes. Ejemplos: alcohol cetílico, alcohol estearílico y alcohol cetosteárico (Olmos, 2017,p.3).

El alcohol cetílico es una base anhidra insoluble en agua que tiene la función de fijar el agua, de esta manera ayuda a la formación de la emulsión w/o y se puede añadir compuestos solubles en agua (Altamirano, 2015,p.39).

- Ácidos grasos y sus ésteres:

Dentro de este grupo se encuentran el ácido esteárico que tiene la propiedad de aumentar la viscosidad, y produce un efecto evanescente. Los ácidos se usan como coemulgentes, mientras que los éteres se usan como emulgentes. El miristato de isopropilo además aporta emoliencia y baja untuosidad y el monoestearato de glicerilo tiene la capacidad de actuar como tensioactivo brindando estabilidad a la emulsión y se usa como factor de consistencia (Olmos, 2017,p.3).

- Hidratantes/Humectantes:

Los polioles tienen propiedades humectantes, se utilizan en la formulación una cantidad del 5 a 10%, con la finalidad de evitar la pérdida de agua contenida en la emulsión. Al ser moléculas higroscópicas ejercen acción hidratante en el estrato córneo, cuando la humedad relativa del aire es alta, ya que de lo contrario tiende a captar agua de la piel ocasionando su deshidratación. Es por ello que no es recomendable usar cantidades mayor al 10% de la formulación ya que en cantidades muy altas los polioles crean una capa que no se absorbe por la piel dando una sensación grasosa y pegajosa de la piel. Ejemplo: glicerina y el propilenglicol (Olmos, 2017,p.4).

- Tensioactivos/Emulsificantes

Son sustancias químicas que se encargan de disminuir la tensión superficial entre las dos fases (acuosa y oleosa), logrando así formar y estabilizar una emulsión. Se caracterizan por poseer una parte hidrófila y una parte lipófila. Para la medir la relación que existe entre la parte hidrófila y la lipófila de los tensioactivos se utiliza la escala HLB, por sus siglas en inglés que significa Equilibrio Hidrófilo-Lipófilo, la cual permite medir la hidrofilia de un tensioactivo, por lo que aquellos valores más altos de HBL quiere decir que son tensioactivos más polares, mientras que valores bajos de HBL corresponden a tensioactivos menos polares (Lillini *et al.*, 2016,p.10).

Sustancias naturales como las grasas y los aceites que forman la parte oleosa de las emulsiones, presentan diferentes valores de HBL para lograr formar emulsiones ya sea O/W o W/O, los cuales se denominan como HBL requerido (HLB_R) para la fase oleosa de una emulsión (Lillini *et al.*, 2016,p.11).

Este tipo de sustancias forman un sistema de bases auto-emulsionantes que se produce con ingredientes naturales, como por ejemplo el estereato de sacarosa, estereato de glicerilo, lecitina de soya, entre otros, que imitan la barrera lipídica natural de la piel, es por ello que en una formulación se debe combinar tensioactivos con un HBL alto y un HBL bajo. Estas sustancias se

consideran suaves y no irritantes con una afinidad específica para la piel, que a más de formar la emulsión otorga a la crema propiedades como hidratación y suavidad para la piel (Altamirano, 2015,p.39).

Cabe destacar que la lecitina de soya de tipo fosfolípido, posee un carácter anfótero, por lo que facilita tanto la formación de emulsiones o/w y w/o (Olmos, 2017,p.7).

- Conservantes

Protegen el producto cosmético frente al crecimiento y proliferación de microorganismos (bacterias y hongos) y de esta manera previenen el deterioro de la crema, ya que evitan la oxidación de las grasas, putrefacción de las proteínas y la fermentación de los carbohidratos. Ejemplo: metilparabeno y el etilparabeno (Altamirano, 2015,p.34).

- Antioxidantes

Dentro de este grupo tenemos la vitamina E, conocido como tocoferol, es una vitamina liposoluble, que crea una reacción con los radicales libres que son los responsables de formar sustancias reactivas con el oxígeno (ROS), evitando de esta manera la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Además, brinda un efecto hidratante en la piel (Altamirano, 2015,p.42).

- Colorantes y perfumes

Son sustancias que tiene como finalidad exaltar al producto cosmético elaborado para llamar la atención del cliente.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Localización y recolección de la droga vegetal

La recolección se realizó en el cantón de Saquisilí localizado en la Provincia de Cotopaxi, el cual presenta una altitud de 2.240 a 4.280 msnm (GAD Saquisilí, 2014,p.2), por lo que la planta Ñachag (*Bidens andicola*) recibe una alta emisión de rayos ultravioleta siendo de gran importancia su estudio, el cual se llevó a cabo en los Laboratorios de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Acondicionamiento y control de calidad de la droga vegetal

Una vez recolectada las partes aéreas *B. andicola* se procedió a su selección, limpieza, secado (temperatura de 40 °C) y triturado, con el fin de facilitar la realización de los siguientes análisis:

2.2.1 Análisis del contenido de humedad

Se llevó a cabo a través del método gravimétrico, que consiste en la desecación de la droga vegetal, con el fin de medir la pérdida de su masa. Para ello se pesó 2g de la planta seca la cual se colocó en una cápsula de porcelana (previamente tarada hasta masa constante), se sometió por 3 horas a la estufa a una temperatura de 105°C, luego se colocó en una desecadora, dejándola enfriara hasta temperatura ambiente y posterior se pesó, repitiendo las veces que sean necesarias todo este proceso, pero solo a una hora en la estufa hasta que se obtenga una masa constante. Con los datos obtenidos se procede a realizar el cálculo mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

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

Dónde,

Hg: pérdida de peso por desecación (%).

M_2 : masa de la cápsula con la muestra a analizar (g).

M_1 : masa de la cápsula con la muestra a analizar desecada (g).

M: masa de la cápsula vacía.

100: factor matemático (Miranda, 1992,p.34).

2.2.2 Análisis del contenido de cenizas totales

Se carbonizó 2g de planta seca y molida, para ello se colocó en un crisol (previamente tarado) y se sometió a la mufla por 2 horas a una temperatura de 700°C, posterior se dejó enfriar en la desecadora hasta temperatura ambiente y se pesó. Este proceso se repite, pero con un tiempo de 30 minutos en la mufla, hasta la obtención de una masa constante. Por último, los resultados obtenidos se expresan en la siguiente fórmula:

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

Dónde,

C: porcentaje de cenizas totales en base hidratada (%).

M: masa del crisol vacío(g).

M_1 : masa del crisol con la porción de ensayo (g).

M_2 : masa del crisol con la ceniza (g).

100: factor matemático (Miranda, 1992,p.32).

2.2.3 Análisis del contenido de cenizas solubles en agua

Se añadió 15 ml de agua a las cenizas totales, se tapó y se dejó hervir por 5 minutos. Posterior se filtró con la ayuda de papel filtro, este papel se colocó al mismo crisol y se procedió a carbonizar en la mufla a 700 °C por 2 horas. Repitiendo el proceso hasta masa constante. Los resultados se expresaron en la siguiente fórmula:

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

Dónde,

Ca: porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada (%).

M_2 : masa del crisol con las cenizas totales (g).

M_a : masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

M_1 : masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M: masa del crisol vacío (g).

100: factor matemático (Miranda, 1992,p.33).

2.2.4 Análisis del contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Se añadió 3 ml de ácido clorhídrico al 10% a las cenizas totales, se tapó con vidrio reloj el crisol y se dejó a baño maría por 10 minutos, y posterior se realizó el mismo procedimiento desde el filtrado que en las cenizas solubles en agua. Y los datos obtenidos se aplicó a la siguiente fórmula:

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

Dónde,

B: porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada (%).

M_2 : masa del crisol con la ceniza (g).

M_1 : masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M: masa del crisol vacío.

100: factor matemático (Miranda, 1992,p.33).

2.3 Tamizaje fitoquímico de la droga vegetal

Consiste en la preparación de extractos vegetales, para ello se utilizó las partes aéreas de *Bidens andicola* seca y triturada, la cual se sometió a diferentes solventes de manera secuencial: éter etílico, etanol y agua, con los cuales se realizó varias pruebas con diferentes reactivos, otorgándonos datos cualitativos que nos ayudó a la determinación de la presencia o ausencia de metabolitos secundarios que tiene la droga vegetal (Miranda, 1992,p.38-45).

2.4 Medición del Factor de Protección Solar (FPS) de los diferentes extractos de *Bidens andicola*.

El modo de preparación de los extractos de *Bidens andicola* fue de la siguiente manera:

- Extracto 1

Se pesó 2 gramos de planta seca y se extrajo con 3 veces el peso del residuo en volumen con etanol al 96% por maceración durante 48 horas protegido de la luz. Luego se filtró en un vaso de precipitación utilizando papel filtro obteniendo el residuo sólido y el extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola*. Finalmente se midió el volumen del extracto para el cálculo de la concentración.

- Extracto 2:

Se pesó 2 gramos de planta seca y se extrajo con 3 veces el peso del residuo en volumen con etanol al 96% por maceración durante 48 horas protegido de la luz. Posterior se filtró en un vaso de precipitación utilizando papel filtro, obteniendo el residuo sólido y el extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola*.

Desengrasado: Se colocó el extracto etanólico de *Bidens andicola* en un embudo de separación y se añadió 5 ml de n-hexano, se agitó por 5 minutos hasta obtener la formación de dos fases. La fase oleosa se desecha y con la otra fase se repite el proceso como mínimo 3 veces hasta obtener el extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* desengrasado.

- Extracto 3:

Se pesó 2 gramos de planta seca y se extrajo con 3 veces el peso del residuo en volumen con etanol-agua al 70% por maceración durante 48 horas protegido de la luz. Luego se filtró en un vaso de precipitación utilizando papel filtro obteniendo el residuo sólido y el extracto hidroalcohólico al 70% de *Bidens andicola*. Finalmente se midió el volumen del extracto para el cálculo de la concentración.

- Extracto 4 y 5:

Se pesó 2 gramos de planta seca y se extrajo con 3 veces el peso del residuo en volumen con acetato de etilo por maceración durante 48 horas protegido de la luz. Luego se filtró en un vaso de precipitación utilizando papel filtro obteniendo el residuo sólido y el extracto con acetato de etilo *Bidens andicola*. Finalmente se midió el volumen del extracto para el cálculo de la concentración.

Tabla 1-2 Extractos de *Bidens andicola* utilizando diferentes solventes

Extractos	Planta seca y molida	Solvente
Extracto 1	<i>Bidens andicola</i>	Etanol 96% sin desengrasar
Extracto 2	<i>Bidens andicola</i>	Etanol 96% desengrasado
Extracto 3	<i>Bidens andicola</i>	Etanol-agua 70%
Extracto 4	<i>Bidens andicola</i>	Acetato de etilo
Extracto 5	<i>Bidens andicola</i>	Acetato de etilo

Realizado por: Diana Pacheco. 2018

Para la medición se utilizó el espectrofotómetro UV a un rango de 290 a 320 nm, se preparó los extractos a una concentración de 20 ppm, 200 ppm, 400 ppm y 600 ppm, como blanco se utilizó para el extracto 1 etanol al 96%, extracto 2 etanol al 96%, extracto 3 etanol al 70%, extracto 4 etanol al 96% y para el extracto 5 acetato de etilo. Se obtuvo de cada extracto datos de absorbancia por triplicado, lo cuales se aplicó en la Ecuación de Mansur y finalmente se obtuvo el Factor de Protección Solar de cada extracto, seleccionando así el mejor solvente para los posteriores análisis y formulación de la crema fotoprotectora.

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

Dónde,

SPF: Factor de Protección Solar.

EE (λ): espectro de acción eritemal.

I (λ): intensidad del espectro solar.

Abs (λ): absorbancia del producto.

CF: factor de corrección igual a 10, se determina mediante un filtro solar estándar que contiene 8% de homosalato con un FPS de 4 (Oliveira, *et al.*, 2013,p.124).

Tabla 2-2. Función del producto normalizada para el cálculo del FPS

Wavelength (λ 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

EE – erythema effect spectrum; I – solar intensity spectrum

Fuente: (Oliveira, *et al.*, 2013,p.124)

Tabla 3-2. Tipo de fotoprotector según el FPS establecido por COLIPA

Tipo de fotoprotector	FPS, COLIPA
Bajo	2,4,6
Medio	8,10,12
Alto	15,20,25
Muy alto	30,40,50
Ultra	50+

Fuente: (COLIPA, 2011)

2.5 Control de calidad del extracto etanólico de *Bidens andicola*

Se realizó estudios organolépticos, medición del pH, medición de la densidad relativa y del índice de refracción, los cuales se realizó siguiendo la metodología del Manual de Farmacognosia y Productos Naturales de Miranda Migdalia (Miranda Migdalia, 1992,p.56-58).

2.6 Análisis del contenido de flavonoides totales expresados como quercetina

Se preparó la muestra de extracto etanólico al 96% de *B. andicola* a una concentración de 600 ppm, este ensayo se realizó por triplicado, que consistió en el siguiente proceso:

1. Se colocó en un tubo de ensayo 1 ml de la muestra, 4 ml de agua destilada y 0,3 ml de solución de nitrato de sodio al 5%, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos.
2. Posterior se añadió 0,3 ml de tricloruro de aluminio al 10%, se agitó por 1 minuto y se dejó reposar por 5 minutos.
3. Luego se colocó 2 ml de NaOH 1 molar, se agitó por 15 segundos y se dejó reposar en por 15 minutos, protegido de la luz y a temperatura ambiente.
4. Transcurrido el tiempo se procedió a la cuantificación de flavonoides totales en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm, el blanco que se utilizó se preparó siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito sin usar el extracto.
5. Finalmente se registró las absorbancias y se realizó el cálculo mediante la ecuación de la recta, que se obtuvo por la curva de calibración de quercetina que es el estándar para el cálculo de flavonoides totales (Boukhris *et al.*, 2013, pp.1207-12010).

El valor obtenido de flavonoides totales se lo expresó como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de planta seca (mgEQ/g de planta seca), que se calculó a través de la aplicación de la recta que se obtuvo mediante la realización de la curva de calibración de quercetina que fue el estándar.

2.7 Análisis del contenido de fenoles totales

Primero se preparó el extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* a una concentración de 600 ppm, y se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se colocó 250 ul de la muestra en un matraz aforado de 25 ml.
2. Se adicionó 15 ml de agua destilada y 1,25 ml del reactivo de Folin previamente preparado, se homogenizó en un vortex por 30 segundos y se dejó reposar por 8 minutos.
3. Luego se añadió 3,75 ml de solución de carbonato de sodio a 7,5%, se aforó con agua destilada y se agitó por 5 segundos.
4. Posterior se dejó reposar por 2 horas en oscuridad.
5. Después se tomó las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.
6. Finalmente, con los datos obtenidos de absorbancias se aplicó en la fórmula para fenoles totales.
7. Se realizó el ensayo por triplicado.

El valor de fenoles totales que se obtuvo se lo expresó como miligramos de ácido gálico por gramo de planta seca (mg EGAE/g planta seca) (Huang, et al, 2012, pp. 120-125).

2.8 Determinación de la capacidad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante de las partes aéreas de *Bidens andicola*, a través del desarrollo de la prueba de radical estable de DPPH*, que es un radical libre que en su nomenclatura química se lee como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil libre, en su forma libre se absorbe a una longitud de onda de 517 nm. Se obtiene disolviendo el reactivo en un medio orgánico como por ejemplo en el metanol. Los valores de absorbancias en el espectrofotómetro permiten estimar la actividad antioxidante, donde la disminución de los valores indica que sí se está ejerciendo el efecto antioxidante (Tohidi, et al, 2017,p.154).

- Se preparó el reactivo de DPPH*, para ello se pesó 6,9 g del reactivo de DPPH, se añadió en un balón de aforo de 250 ml, se aforó con metanol y se estabilizó.
- Luego se preparó los extractos etanólicos de *Bidens andicola* a diferentes concentraciones:10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm.
- Para la realización del ensayo se adicionó en un tubo de ensayo 3,9 ml del reactivo de DPPH* y 0,1 ml de la muestra.
- Luego se dejó incubar a 30min a una temperatura de 37 °C
- Transcurrido el tiempo se sacó de la incubadora y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.
- Posterior se procedió a la medición de las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm, se usó como blanco 3,9 ml de metanol más 0,1 ml de etanol al 96% y se registró las absorbancias.
- Los datos registrados de las absorbancias se aplicaron en la fórmula y se obtuvo el porcentaje de inhibición de los radicales libres.

$$I\% = \frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control} \times 100$$

Donde,

% I: porcentaje de inhibición de radicales libres.

Abs control: absorbancia de la muestra de la reacción control que contienen los reactivos excepto de la prueba.

Abs muestra: absorbancia del extracto de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

- Por último, se calculó actividad antioxidante IC50 (concentración media efectiva máxima) del extracto etanólico de *Bidens andicola* a través de la ecuación de la recta (Tohidi, et al, 2017,pp.150-159).

2.9 Barrido espectrofotométrico con el extracto etanólico *Bidens andicola*.

- Se preparó el extracto etanólico de *B. andicola* a una concentración de 1345ppm.
- Luego se midió en el espectrofotómetro UV-Visible con un rango de longitud de onda de 200 a 500nm y como blanco se usó etanol al 96%.
- Finalmente se obtuvo los picos y las absorbancias del extracto analizado.

2.10 Prueba de irritación ocular (HET- CAM) del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola*.

HET-CAM es una prueba *in vitro* subjetiva que se caracteriza por la utilización de la membrana corioalantoidea de huevos de gallina fecundados, que tiene la finalidad evaluar la irritación de la mucosa ocular y nasal producida por un cosmético, ya que el epitelio de la membrana corioalantoidea es similar a la mucosa ocular y nasal, además esta membrana presenta una amplia red de vasos sanguíneos los cuales pueden sufrir lesiones de hemorragia, lisis y coagulación al estar en contacto directo con sustancias peligrosas siendo el centro de evaluación. Esta prueba cumple con el principio de las 3Rs (refinamiento: reducción del sufrimiento, reemplazamiento y reducción en el número de animales de experimentación a usar), ya que los huevos de gallina incubados por 10 días presentan embriones que aún no poseen el sistema nervioso bien desarrollado, por lo que no sienten dolor, son más baratos y los resultados se obtienen en horas (Espinoza, 2015,p.51).

Es así que se realizó la prueba de irritación ocular del extracto de *Bidens andicola* a través del método HET-CAM, que consistió en el siguiente proceso:

1. Primero se dejó incubar 15 huevos por diez días, con la ayuda de la incubadora de huevos.
2. Para iniciar con el ensayo se preparó:
 - Control positivo: Agua destilada
 - Control negativo: Hidróxido de sodio 0,1M
 - Muestra (Extracto etanólico *Bidens andicola*): se preparó a concentraciones de: 250 ppm, 500 ppm y 1345ppm.
3. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la apertura de la cámara de aire del huevo con la ayuda de una pinza hasta llegar a la membrana corioalantoidea.
4. Después se añadió sobre la membrana corioalantoidea 300 ul de agua destilada (control negativo) y se registró el tiempo en segundos si se produjo la aparición de hemorragia, lisis o coagulación.

5. Se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito con hidróxido de sodio 0,1 M (control positivo) y con las diferentes concentraciones del extracto preparado.
6. El ensayo se realizó por triplicado.
7. Posterior todos los datos obtenidos se aplicaron en la siguiente fórmula:

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

Dónde,

I.I: es el índice de irritación.

TH: es el tiempo de aparición de hemorragia.

TL: es el tiempo de aparición de lisis.

TC: es el tiempo de aparición de coagulación. (Costa *et al.*, 2015,p.414)

8. Finalmente se comparó los resultados con el rango HET-CAM y se categorizó según la siguiente tabla

Tabla 4-2. Categorización de irritación

Rango HET-CAM	Categorías de irritación
0-0,9	No irritante
1,0-4,9	Irritante leve
5,0-8,9	Irritante moderado
9,0-21,0	Irritante severo

Fuente: (Costa *et al.*, 2015,p.)

2.11 Preparación de las formulaciones con extracto *Bidens andicola*.

Tabla 5-2. Formulaciones de cremas fotoprotectoras al 100%

INGREDIENTES	FORMULACIONES				FDA (%)	PROPIEDADES
	1	2	3	4		
FASE OLEOSA						
Cera de abeja	6,7	6,7	6,7	6,7	3,5	Efecto oclusivo Aumenta la viscosidad
Ácido esteárico	6,7	6,7	6,7	6,7	22	Efecto evanescente, coemulgente
Alcohol cetílico	5	5	5	5	6	Emoliente, oclusivo y coemulgente
Glicerina	4,3	4,3	4,3	4,3	4	Humectante
Manteca de cacao	3,3	3,3	3,3	3,3	N/A	Emoliente
Aceite de oliva	10	-	-	-	27	Antioxidante Lubricante Emoliente
Aceite de aguacate	-	10	-	-	27	Emoliente
Aceite de coco	-	-	10	-	27	Lubricante Emoliente
Aceite de girasol	-	-	-	10	27	Lubricante
Estereato de sacarosa	3,3	3,3	3,3	3,3	7	Tensioactivo
FASE ACUOSA						
Vitamina E	0,02	0,02	0,02	0,02	0,002	Antioxidante
Metil-parabeno	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	Conservante
Extracto vegetal	19,3	19,3	19,3	19,3		Fotoprotector y antioxidante
Agua destilada	csp 100g	csp 100g	csp 100g	csp 100g		Vehículo

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Fuente: (FDA, 2018)

1. Se preparó primero la Fase oleosa que consistió en fundir a una temperatura de 60°C todos los ingredientes de origen graso.
2. Luego se preparó la fase acuosa que consistió en mezclar a una temperatura de 60 °C todos los ingredientes solubles en agua.
3. Se mezcló la fase acuosa en la fase oleosa y se agitó continuamente hasta la obtención de una emulsión homogénea.
4. Y por último se colocó las cremas fotoprotectoras en envases sépticos.

2.12 Control de calidad de las cremas fotoprotectoras

2.12.1 Determinación del Factor de Protección Solar (FPS) de las cremas fotoprotectoras.

Para la realización de esta prueba se pesó 5 gramos de la cada una de las cremas fotoprotectoras y se disolvió en 100 ml de etanol. Luego realizó la lectura de las absorbancias mediante la utilización del espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizó el blanco de etanol al 96%. Los datos obtenidos se aplicaron en la ecuación de Mansur para la obtención del Factor de Protección Solar (FPS). Y finalmente se comparó los valores de FPS y se eligió la mejor crema fotoprotectora.

2.12.2 Ensayo de irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

CAM-TBS es una prueba objetiva complementaria a la prueba HET-CAM que permite evaluar de manera cuantitativa la cantidad de azul de tripán absorbida por la membrana corioalantoidea que ha sufrido daño, debido al contacto con sustancias tóxicas que pueden causar muerte celular de la membrana. Las células muertas o dañadas tienden a teñirse de colorante debido a que se unen con las proteínas citosólicas que se encuentran dentro de éstas células, por lo que mientras mayor es la cantidad de colorante absorbido mayor es la cantidad de células dañadas o muertas (Espinoza, et al, 2015,p.28).

El ensayo de CAM-TBS se realizó mediante el siguiente proceso:

1. Para la preparación de las muestras de ensayo se pesó 5 gramos de la crema fotoprotectora con el mayor valor de FPS y se disolvió en 100 ml de agua destilada a una concentración de 1345 ppm.
2. Para la realización del ensayo se dejó incubar 15 huevos por diez a una temperatura de 37°C y humedad de 60%.

3. Transcurrido el tiempo se realizó la apertura del huevo hasta llegar a la membrana corioalantoidea.
4. Se colocó el anillo de goma sobre la membrana corioalantoidea sin romperla.
5. Posterior se añadió 300 ul del extracto por 20 segundos y luego se lavó con suero fisiológico.
6. Después se colocó 500 ul del colorante azul de tripán por un minuto y se lavó con agua destilada hasta desechar la mayor parte del colorante.
7. Se cortó la membrana y se pesó, con el finde eliminar el sesgo que existe de diferencia del tamaño de cada muestra.
8. Luego se introdujo en un tubo de ensayo el cual contenía 5 ml de metilformamida.
9. Se procedió a la centrifugación de todos los tubos a 1500 rpm durante cinco minutos.
10. Y se midió las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.
11. Para la realización del control negativo se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito sin añadir la muestra de ensayo y para el control positivo se añadió hidróxido de sodio 0,1 M.
12. La prueba se realizó por triplicado.
13. Los datos obtenidos se aplicaron a la siguiente fórmula:

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

Dónde,

CA: cantidad de colorante absorbido.

b: concentración de colorante /mg de membrana (Camones, et al, 2013,p.15).

14. Finalmente se comparó los resultados con la tabla 6-2.

Tabla 6-2. Categorización del CAM-TBS

Cantidad de colorante absorbido	Categoría
< 0,100 nmoles/mg	No irritante
0,100 – 0,150 nmoles/mg	Irritante moderado
> 0,150 nmoles/mg	Irritante severo

Fuente:(García *et al.*, 2004,p.104)

2.12.3 Determinación de los requisitos organolépticos

Se realizó la determinación del olor, color, aspecto y pH utilizando la metodología establecida en el Folleto de Miranda (Miranda, 1992,p.57-58).

2.12.4 Medición del pH

El pH es un parámetro numérico que permite determinar el potencial de hidrógeno de una solución, caracterizándola a través de la escala de acidez o alcalinidad como una solución ácida (<7), alcalina (>7) o neutra (pH 7) (Chaparro, et al, 2015,p.7).

Se pesó 1g de la crema fotoprotectora, se dispersó en 10 ml de agua destilada, se midió en el pH-metro a una temperatura de 20 °C y se registró el valor de pH obtenido.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de la droga vegetal

El proceso de recolección, selección, acondicionado, secado y triturado del material vegetal se lo realizó utilizando todas las medidas de higiene, que mediante el proceso de control de calidad el cual es fundamental para garantizar la seguridad del producto, se realizó las posteriores pruebas pertinentes a esta investigación. Los resultados de control de calidad de la droga seca de *Bidens andicola* fueron los siguientes:

Tabla 1-3. Resultados del control de calidad de la droga vegetal.

Ensayos	Resultados de <i>Bidens andicola</i> %	Farmacopea de los Estados Unidos (USP#28)
Contenido de humedad	8 ±0,056	14 %
Contenido de cenizas totales	4,8 ±0,26	12 %
Contenido de cenizas solubles en agua	3,5 ±0,14	7 %
Contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	1,4 ±0,048	5 %

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

3.1.1 Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad de las partes aéreas de *Bidens andicola* se lo realizó a partir del método gravimétrico donde el resultado fue de 8% de humedad, porcentaje que al comparar con la USP se encuentra dentro de los límites establecidos, lo cual indica que la droga vegetal es capaz de mantener la estabilidad de los compuestos y por un tiempo moderado se puede conservar libre de crecimiento y proliferación bacteriano siendo favorable para la ejecución de este estudio.

3.1.2 Determinación del contenido de cenizas totales

El contenido de cenizas totales de la droga vegetal de las partes aéreas de *Bidens andicola* se determinó a través del método gravimétrico obteniendo como resultado un valor de 4,8%, porcentaje que se encuentra dentro de los límites establecidos al comparar con la norma USP, donde establece que el valor máximo permitido de cenizas totales es del 12%. Es así que mediante la evaluación de este parámetro de calidad se logró conocer que la droga vegetal *Bidens andicola* es de calidad ya que se encontró libre de contaminación.

3.1.3 Determinación de cenizas solubles en agua

Este ensayo indica el contenido de materia orgánica que posee una droga vegetal. El porcentaje que se obtuvo de la droga vegetal de *Bidens andicola* fue de 3,5%, porcentaje que se encuentra dentro de los límites permitidos por la USP, el cual establece que el valor máximo debe ser de 7%. Por lo que el contenido de materia orgánica de la droga vegetal fue bajo.

3.1.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Este ensayo se realizó a partir del método gravimétrico donde el porcentaje que se obtuvo de la droga vegetal de *Bidens andicola* fue de 1,4%, porcentaje que se encuentra dentro de los límites establecidos por la USP, el cual indica que está libre de contaminación por arena y tierra sílice.

3.2 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó con la finalidad de identificar de manera cualitativa los diferentes metabolitos secundarios que contiene las partes aéreas de *Bidens andicola*, a través de la ejecución de reacciones de coloración y de precipitación. Para la extracción de los metabolitos secundarios que utilizó solventes de diferente polaridad creciente como son: éter etílico, etanol al 96% y agua destilada respectivamente, donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de *Bidens andicola*

Ensayos	Tipo de metabolito	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Sudán	Aceites y grasas	-	N/A	N/A
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-
Mayer	Alcaloides	-	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-	-
Balget	Lactonas y cumarinas	++	+	N/A
Lieberman-Burchard	Triterpenos y esteroides	++ (verde intenso visible)	++ (verde intenso visible)	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	+	N/A
Resinas	Resinas	N/A	-	N/A
Fehling	Azúcares reductores	N/A	-	+
Espuma	Saponinas	N/A	+	+
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	N/A	++ (verde intenso)	++ (verde intenso)
Borntrager	Quinonas	N/A	+++	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	+++	++
Antocianidina	Antocianidina	N/A	++	N/A
Mucílagos		N/A	N/A	+
Ninhidrina		N/A	-	N/A
(+++) Abundante	(++) Moderado	(+) Escaso	(-) Ausencia	(N/A) No aplica

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

A través de los diferentes ensayos que se realizó al extracto etéreo de *Bidens andicola* se logró la identificación de lactonas y cumarinas ya que la reacción de balget dio positivo (++) y la presencia de triterpenos y esteroides mediante la reacción de Lieberman-burchard con una coloración verde intenso visible. Posterior con el extracto alcohólico de *Bidens andicola* se identificó también triterpenos y esteroides con la reacción de Lieberman-buchard que dio positivo, lactonas y cumarinas con la reacción positiva de balget, catequinas, compuestos fenólicos a través de la reacción de cloruro férrico dando una coloración verde intenso (++) , así también se identificó la presencia de flavonoides mediante la reacción positiva (+++) de shinoda, quinonas con la reacción positiva de borntrager, antocianidinas y saponinas. Y por último con el extracto acuoso de *Bidens andicola* se logró confirmar la presencia de compuestos fenólicos,

flavonoides y saponinas a través de la identificación anteriormente mencionada, además se identificó la presencia de mucílagos y azúcares reductores mediante la reacción positiva de Fehling.

Los resultados obtenidos de este estudio fitoquímico al comparar con estudios anteriores como estudios realizados por (Tinajero, 2015), (Vinueza et al. 2017) y (De Tommasi, et al, 1998), se corroboró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y catequinas, que son metabolitos secundarios de interés para esta investigación por su actividad fotoprotectora y antioxidante.

3.3 Factor de Protección Solar (FPS) *in vitro*.

El factor de protección solar de los 5 extractos de *Bidens andicola* se determinó a concentraciones de 20, 200, 400 y 600ppm y como blanco se usó etanol al 96% para el extracto etanólico sin desengrasar al 96%, extracto etanólico al 96% desengrasado, extracto hidroalcohólico al 70% y extracto 1 de acetato de etilo. Se usó como blanco acetato de etilo para el extracto 2, donde se obtuvo los siguientes resultados calculando con la ecuación de Mansur:

Tabla 3-3. Resultados del Factor de Protección Solar (FPS) *in vitro*

Sustancia Fotoprotectora	FPS <i>In vitro</i>			
	20 ppm	200 ppm	400 ppm	600 ppm
Extracto etanólico al 96% sin desengrasar	0,7	7	14	23
Extracto etanólico al 96% desengrasado	0,7	3	5	8
Extracto hidroalcohólico 70%	0,4	4	12	18
Extracto 1 de acetato de etilo	0,5	5	10	15
Extracto 2 de acetato de etilo	0,7	5	17	25

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

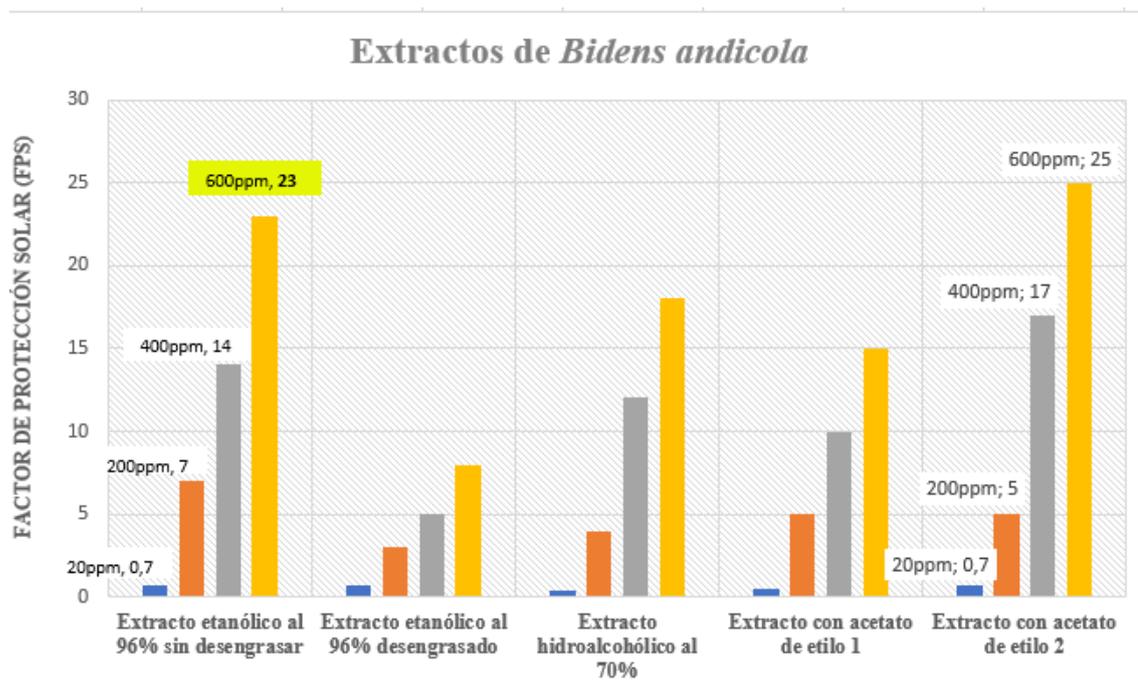


Gráfico 1-3. Factor de protección solar para los diferentes extractos de *Bidens andicola*
Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Tabla 4-3. Tipo de fotoprotector según el FPS *in vitro* obtenido de los extractos de *Bidens andicola*

Número de extracto	Sustancia fotoprotectora	FPS <i>in vitro</i> (600ppm)	Tipo de fotoprotector
1	Extracto etanólico al 96% sin desengrasar	23	Alto
2	Extracto etanólico al 96% desengrasado	8	Medio
3	Extracto hidroalcohólico al 70%	18	Alto
4	Extracto de acetato de etilo	15	Alto
5	Extracto de acetato de etilo	25	Alto

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

La tabla 13-3 muestra los resultados obtenidos del Factor de Protección Solar (FPS) evaluados a concentraciones de 20, 200, 400 y 600ppm de cada uno los extractos de *Bidens andicola* preparados con diferentes solventes, donde se puede apreciar que a la concentración de 600ppm se obtuvo el factor de protección más alto que fue de 25 para el extracto 5 de acetato de etilo, seguido por el extracto etanólico al 96% sin desengrasar con un FPS de 23, posteriormente el extracto hidroalcohólico al 70% con FPS de 18, al que le sigue el extracto 4 de acetato de etilo con un FPS de 15 y por último el extracto etanólico al 96% desengrasado con un FPS de 8. Estos resultados se compararon con la clasificación COLIPA (2011) la cual establece el nivel de protección solar según el FPS, es así que se clasificó como alto el nivel de fotoprotección para los extractos 1, 3, 4 y 5 y como medio el nivel de fotoprotección para el extracto 2.

De esta manera se procedió a la selección del tipo de extracto a utilizar para el desarrollo de las posteriores pruebas pertinentes para la elaboración de la crema fotoprotectora, siendo el FPS más alto de 25 para el extracto 5 con acetato de etilo de *Bidens andicola*, valor que corrobora con los resultados de FPS realizados por Tinajero Mayra (2015) quién indica que puede deberse a que se utilizó como blanco acetato de etilo o a la concentración con la que se realizó la determinación; sin embargo, no se lo eligió debido al difícil acceso y alto costo del solvente. Por lo que se eligió al extracto con el segundo valor más alto de FPS de 23 que correspondió al extracto etanólico al 96% sin desengrasar de *Bidens andicola*, valor de FPS que cumple con lo especificado por la FDA (2011), donde establece que se considera como filtro solar aquellas sustancias que presenten un FPS mayor o igual a 15, por lo que este tipo de extracto es apto para la utilización como filtro solar en las formulaciones de crema fotoprotectora.

3.4 Extrapolación del Factor de Protección Solar (FPS) *in vitro*

Tabla 5-3. Resultado de la extrapolación del factor de Protección Solar del extracto etanólico

Concentración	FPS
20	0,7
200	7,3
400	14
600	23
1345	50

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

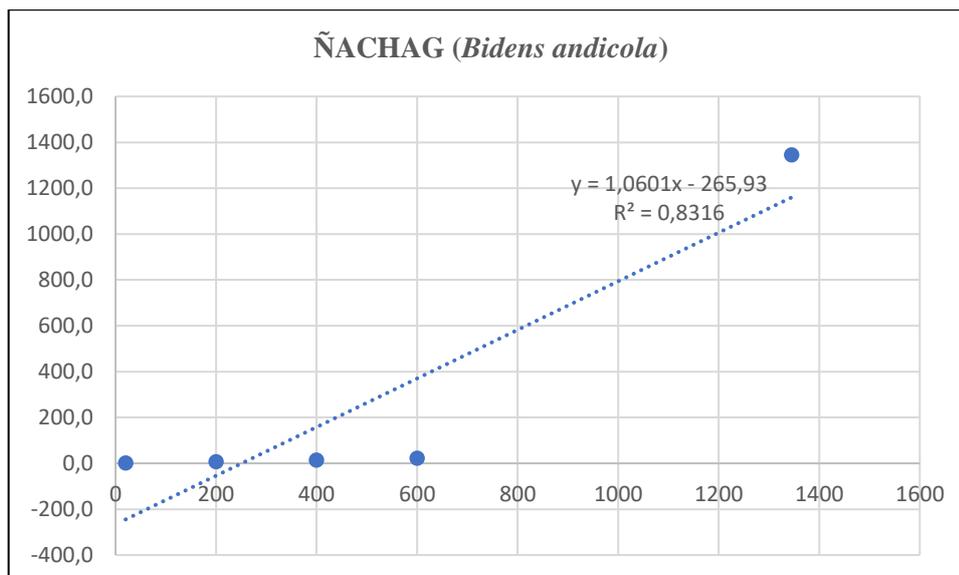


Gráfico 2-3. Curva de calibración del extracto etanólico de *Bidens andicola*
Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Mediante la curva de calibración del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* que se realizó con los valores del FPS *in vitro* obtenidos a 20ppm, 200ppm, 400ppm y 600ppm, se calculó la concentración a ppm con un valor de FPS de 50 mediante extrapolación utilizando la ecuación $y=1,0601x-265,93$, donde se obtuvo una concentración de 1345ppm. Este cálculo se realizó con la finalidad de estimar la concentración a ppm con la que el extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* puede alcanzar un FPS de 50 categorizado como un tipo de fotoprotector muy alto en comparación al FPS *in vitro* de 20 categorizado como alto. Es así que para algunos de los ensayos posteriores y la elaboración de la crema fotoprotectora se utilizó esta concentración ya que al momento de realizar una formulación los componentes del extracto pueden interactuar con los ingredientes a usar creando ya sea un efecto sinergia o antagonista. No se realizó en el espectrofotómetro debido a que no tuvo la capacidad de leer una concentración mayor a 600ppm del presente extracto.

3.5 Control de calidad del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola*.

3.5.1 Parámetros organolépticos

Tabla 6-3. Resultado de los parámetros organolépticos del extracto etanólico *Bidens andicola*

Características	Ext. Alcohólico <i>Bidens andicola</i>
Olor	Herbal
Color	Verde oscuro
Sabor	Amargo
Aspecto	Líquido turbio

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

En la tabla 14-3 se puede observar las características organolépticas del extracto etanólico al 96% de las partes aéreas de *Bidens andicola*, el cual presentó un olor característico a la planta, un color amarillo verdoso, un sabor amargo y un aspecto líquido turbio. Características que fueron similares a estudios realizados por López, E. (2016), lo cual demostró que éstas características son propias del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola*.

3.5.2 Parámetros físicos

Tabla 7-3. Determinación de los parámetros físicos del extracto etanólico 96% de *Bidens andicola*

Parámetros	Ext. Alcohólico <i>Bidens andicola</i>
pH	5,6
Índice de refracción	1,36
Densidad relativa	0,86

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Mediante el análisis de los parámetros físicos del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* se determinó un pH ácido de 5,6, siendo de gran importancia ya que aquellos extractos con valores ácidos presentan en su composición gran cantidad de compuestos fenólicos; la densidad relativa fue de 0,86 lo que indica que es menos densa que el agua, el valor del índice de refracción fue de 1,36. Resultados que pudo se corroborar con los resultados obtenidos por (Tinajero, 2015) quien también realizó estudios del control de calidad del extracto *Bidens andicola*. A través de estos

parámetros evaluados se logró conocer que los metabolitos secundarios presentaron una buena solubilidad con el solvente etanol al 96% utilizado para la extracción. (Orozco,etal, 2013,p.66)

3.6 Contenido de flavonoides totales

Se determinó el contenido de flavonoides a través del método espectrofotométrico utilizando tricloruro de aluminio, para lo cual se elaboró la curva de calibración de quercetina, donde la ecuación de la recta fue: $y=0,0014x + 0,0144$ y un $R^2=0,999$ a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100ppm de las soluciones de quercetina.

Tabla 8-3. Absorbancia del estándar de quercetina

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

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

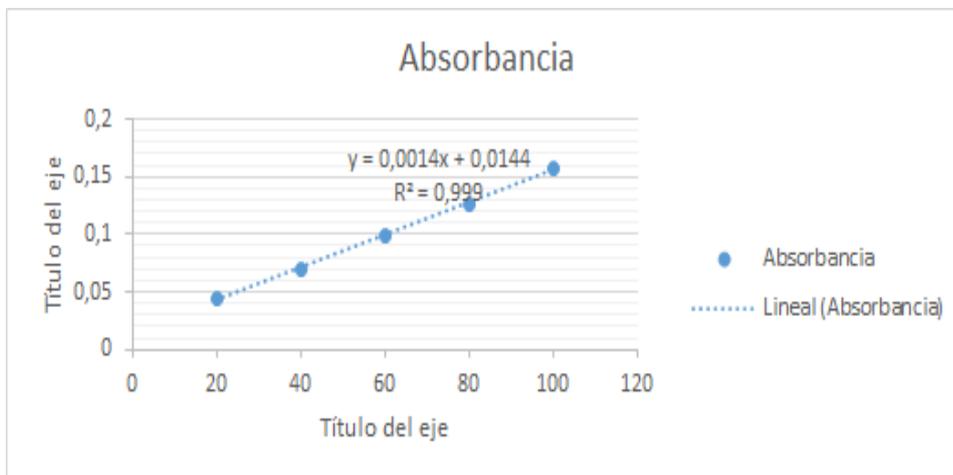


Gráfico 3-3. Curva de calibración de quercetina estándar

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Tabla 9-3. Resultado del contenido de flavonoides totales del extracto etanólico de *Bidens andicola*

Sustancia Fotoprotectora	Flavonoides Totales
	mg Equivalentes de quercetina/g de planta seca (mg QE/g planta seca)
Extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>	71,4±0,75

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

La cantidad de flavonoides totales que posee el extracto etanólico al 96% de las partes aéreas de *Bidens andicola* tras el cálculo realizado fue de 71,4 mg QE/g de planta seca, valor que corrobora con el valor del Factor de protección solar *in vitro* obtenido anteriormente. Así también este resultado se consideró verídico al comparar con estudios realizados por De Tommasi et al. (1998) sobre “Flavonol y glucósidos de ésteres de chalcona de *Bidens andicola*” identificaron que *Bidens andicola* en su composición química posee compuestos derivados de quercetina 3-O-metil éter y quercetina, especialmente compuestos de tipo glucósido, donde 3-O-metil éter es un flavonoide considerado como antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno, considerándose como los principales componentes bioactivos con actividad antioxidante localizadas en las partes aéreas de las hojas de *Bidens andicola*.

3.7 Contenido de fenoles totales

Se determinó el contenido de fenoles totales a través del método espectrofotométrico utilizando el reactivo de Folin- Ciocalteu, para ello se realizó la curva de calibración del ácido gálico, donde se obtuvo la ecuación de la recta que fue: $y=0,001x + 0,0017$ con un $R^2=0,999$ con soluciones a diferentes concentraciones, ppm como se observa en la tabla 18-3.

Tabla 10-3. Absorbancias del estándar de ácido gálico

Concentración de ácido gálico	Absorbancia
20	0,023
40	0,041
60	0,061
80	0,082
100	0,242

Fuente: (Barrera, 2017,p.46)

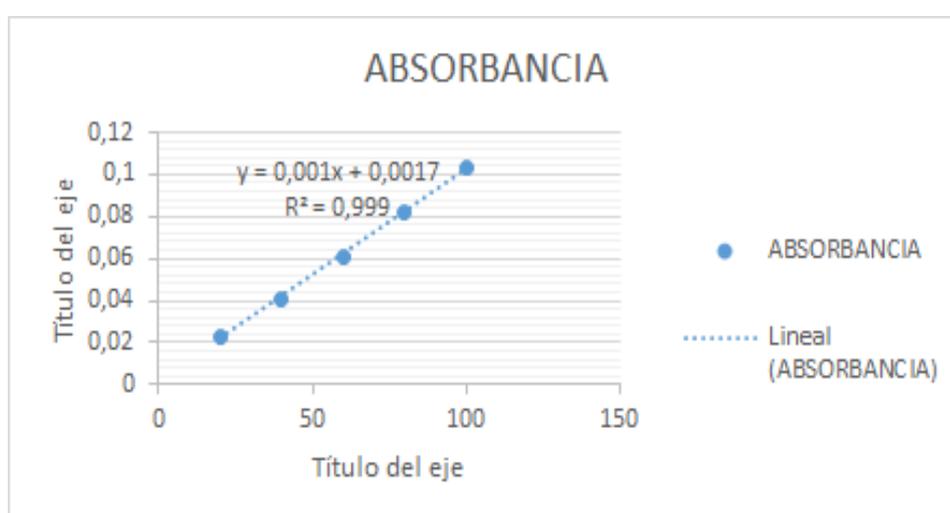


Gráfico 4-3. Curva de calibración del ácido gálico

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Tabla 11-3. Resultado del contenido de fenoles totales del extracto etanólico de *Bidens andicola*

Sustancia Fotoprotectora	Fenoles Totales
	mg Equivalentes de Ácido gálico/g de planta seca
Extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>	178±0,91

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

La cantidad de fenoles totales que contiene el extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* fue de 178 mg GAE/g de planta seca. Resultado que permitió conocer que *B. andicola* posee un elevado contenido de compuestos fenólicos, que al comparar con estudios bibliográficos se puede

corroborar este resultado, es así que estudios realizados por Vinueza, et al. (2017) sobre “La evaluación de la actividad antiinflamatoria y la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico secado y congelado de *B. andicola* en neutrófilos aislados” donde uno de sus estudios dio a conocer el contenido de fenoles totales expresados como GAE/100 g de planta que fue de 12,858% \pm 0.274. Por lo que la actividad fotoprotectora se debe a la presencia de este filtro natural que posee *Bidens andicola*.

3.8 Capacidad captadora de radicales libres

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* a través del ensayo de radical libre estable de DPPH*, para ello se determinó las absorbancias del estándar ácido gálico con DPPH* a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000ppm respectivamente, con el fin de verificar que las absorbancias obtenidas del extracto se encuentren dentro de los valores de absorbancias del estándar.

Tabla 12-3. Porcentaje de captación del radical libre DPPH* del extracto etanólico de *Bidens andicola*

% de Captación del Radical Libre DPPH*		
Concentración, ug/ml	Extracto etanólico al 96% de <i>Bidens andicola</i>	Ácido Gálico,
10	5,17 \pm 0,12	22,55 \pm 2,78
20	5,46 \pm 0,06	34,73 \pm 5,41
50	5,82 \pm 0,06	76,86 \pm 5,59
100	7,52 \pm 0,12	89,59 \pm 0,79
200	9,93 \pm 0,18	90,48 \pm 0,44
500	19,04 \pm 0,24	91,29 \pm 0,15
1000	31,84 \pm 0	92,17 \pm 0,76
IC₅₀	NC	23,27 \pm 1,64

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

La tabla 21-3 muestra el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH* del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000ppm, donde los porcentajes obtenidos son más altos mientras se incrementa la concentración (ppm), comportamiento que fue similar al comparar con los valores de absorbancia del estándar de ácido gálico calculado. Así también se comparó estos resultados con estudios similares realizados por Mannan, et al. (2014) sobre “La evaluación comparativa de la actividad antioxidante de extractos etanólicos de *Averrhoa bilimbi* y *Ginnema silvestre*” donde los resultados del porcentaje de inhibición de los radicales libres de dichos extractos aumentaron mientras mayor era la

concentración, dando a conocer que con el aumento de la concentración de los extractos la actividad del DPPH* aumentaba, ya que es un radical libre que actúa como un sustrato para la evaluación rápida de la actividad antioxidante debido a su estabilidad. Es así que se demostró que el extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* actúa como un buen secuestrante de radicales libres.

También se comparó con estudios realizados por Tohidi, et al. (2016) sobre “Composición de aceites esenciales, fenólicos totales y actividad antioxidante de especies de timo” quienes identificaron que los compuestos fenólicos y flavonoides que contienen grupos hidroxilo son los responsables de la actividad de eliminación de los radicales libres de la mayoría de las plantas. Por lo tanto, los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición del radical libre de DPPH* del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* permitió corroborar con los resultados del contenido de fenoles y flavonoides totales obtenidos anteriormente, determinando así la actividad antioxidante que posee el extracto *Bidens andicola*.

Cabe recalcar que no se calculó el IC_{50} debido a que el resultado del extracto etanólico *Bidens andicola* podía presentar un valor mayor o menor a los valores de referencia de IC_{50} citado en Barrera Ana (2017), por lo que se calculó solo el porcentaje de captación de radical libre DPPH*, con el cual también se puede establecer la actividad antioxidante de dicho extracto evaluado.

3.9 Barrido espectrofotométrico del extracto etanólico *Bidens andicola*

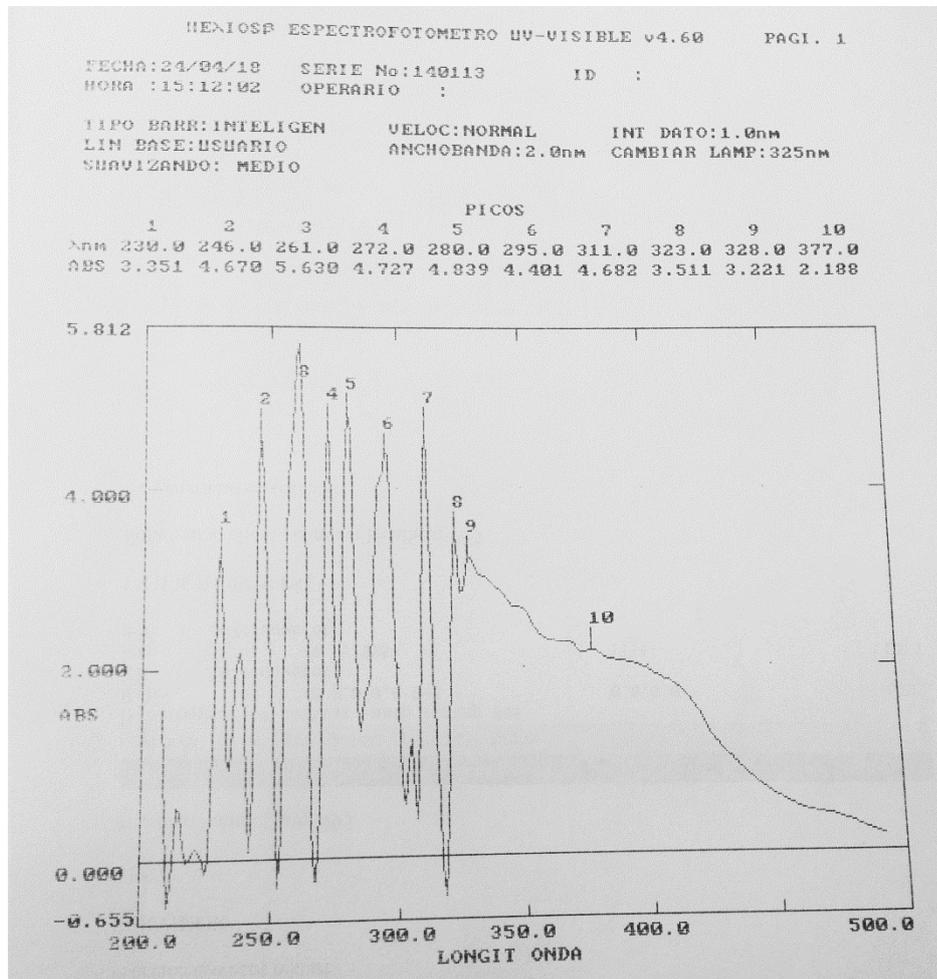


Gráfico 5-3. Picos del barrido espectrofotométrico del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola*.

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Mediante el barrido espectrofotométrico UV-Visible del extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* a 1345ppm se obtuvo diez picos que presentaron diferentes absorbancias dentro del rango de 230 a 377nm, apreciando el pico 3 con el valor más alto de absorbancia de 5,630 a 261 nm como se observa en la gráfica 5-3, absorbancias que al comparar con bibliografía se encuentran dentro del rango de longitud de onda de la radiación UV-A que es de 320 a 400nm Olarte et al. (2016). De esta manera se observó que el extracto etanólico *B. andicola* también posee compuestos fenólicos y flavonoides a nivel de la zona UV-A, que con la Ecuación de Mansur no se logró observar debido a que solo se analiza a una longitud de onda de 290 a 320 nm.

3.10 Prueba de Irritación Ocular HET-CAM

Tabla 13-3. Resultados del índice de irritación HET-CAM de los extractos etanólicos de *Bidens andicola*

Tratamiento	Tipo de control	Tiempo de reacción (segundos)			Índice de irritación	Categoría
		Hemorragia	Lisis	Coagulación		
Agua destilada	Control negativo	301	301	301	0	No irritante
Hidróxido de sodio	Control positivo	25	30	83	11,7	Irritante severo
250 ppm	Extracto 1	301	301	301	0	No irritante
500 ppm	Extracto 2	301	301	301	0	No irritante
1345 ppm	Extracto 3	301	301	301	0	No irritante

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Los índices de irritación (I.I) obtenidos mediante la prueba de irritación ocular HET-CAM de los extractos etanólicos al 96% de *Bidens andicola* a concentraciones de 250ppm, 500ppm y 1345ppm y del agua destilada (control negativo) fue de cero para todos, valores que se comparó con la tabla 4-2. Clasificación de irritación según el rango HET-CAM establecida por Costa, et al. (2015), clasificándolos como no irritantes, ya que ninguno se produjo hemorragia, lisis o coagulación de los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina. Resultados subjetivos que permitió considerar al extracto etanólico al 96% de *Bidens andicola* adecuado para su utilización en formulaciones cosméticos.

Mientras que el hidróxido de sodio 0,1 M presentó un I.I de 11,7 clasificándolo como irritante severo, , valor que al compararlo con bibliografía (Costa *et al.*, 2015,p.416) fue similar, lo cual demuestra que la prueba se realizó de manera correcta ya que el NaOH 0,1 M se utilizó como control positivo para este estudio.

3.11 Control de calidad de la crema fotoprotectora

3.11.1 Factor de Protección Solar (FPS) de las cremas fotoprotectoras

El factor de protección solar de las diferentes formulaciones con extracto etanólico de *Bidens andicola* se determinó a una concentración de 1345ppm, mediante el cálculo de la ecuación de Mansur y se categorizó según el nivel de protección como se observa en la tabla 23-3.

Tabla 14-3. Resultados del Factor de Protección Solar de las cremas fotoprotectoras con extracto etanólico de *Bidens andicola*

Crema fotoprotectora	FPS <i>in vitro</i>	Nivel de protección solar
Formulación #1 (Aceite de oliva)	23±0,31	Alto
Formulación #2 (Aceite de aguacate)	15±0,23	Medio
Formulación #3 (Aceite de coco)	13±0,86	Medio
Formulación #4 (Aceite de girasol)	6±0,67	Bajo

Realizado por: Diana Pcheco, 2018.

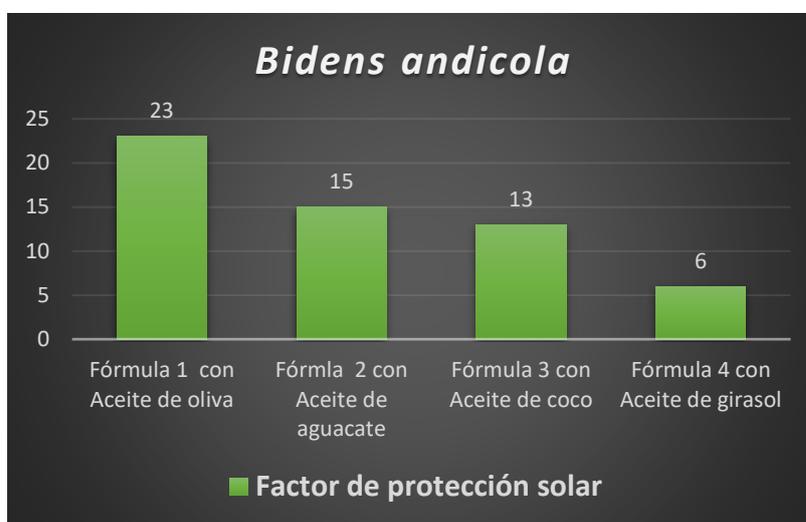


Gráfico 6-3. Factor de protección solar de las diferentes formulaciones con extracto etanólico de *Bidens andicola*

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Los resultados obtenidos mediante ensayo determinaron un valor de FPS de 23 para la formulación 1 con aceite de oliva, seguido de un FPS de 15 para la formulación 2 con aceite de aguacate, posteriormente se obtuvo un FPS de 13 para la formulación 3 con aceite de coco y por último un FPS de 6 para la formulación 4 con aceite de girasol, que mediante gráfico 6-3 se puede apreciar el factor de protección solar más alto que fue de 23 para la formulación 1 con extracto etanólico *Bidens andicola* que contiene aceite de oliva, valor de FPS que se encuentra en un rango alto de nivel de protección solar al comparar con la clasificación establecida por COLIPA (2011). Este valor de FPS de la formulación 1 pudo deberse a la concentración utilizada del extracto etanólico *B. andicola* y al contenido de aceite de oliva, donde los componentes de dicho extracto pudieron interactuar con los componentes del aceite de oliva logrando crear un efecto sinergia de

la actividad fotoprotectora, que mediante estudios bibliográficos realizados por Moudache, et al. (2016) identificaron que la hoja de olivo posee un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, otorgándole a la planta la capacidad fotoprotectora y antioxidante y de esta manera ayudó a que el nivel de protección solar de la crema fotoprotectora se mantenga dentro del nivel de protección alto.

Aunque aún queda el dilema de que tal vez algunos componentes que contiene en su estructura química el extracto etanólico *B. andicola* pudieron interactuar con algunos de los ingredientes excepto del aceite de oliva creando un efecto antagonista de la actividad fotoprotectora, por lo que no se logró obtener un valor de FPS más alto. Sin embargo, el valor de FPS de la formulación 1 cumple con lo especificado por la FDA (2011), donde establece que los filtros solares ya sean físicos, químicos o biológicos deben otorgar un valor de FPS mayor o igual a 15 y presentar propiedades antioxidantes. Además, las cantidades de los ingredientes se encontraron dentro del rango permitido establecido por la FDA (2018), como se muestra en la tabla 24-3. Por lo tanto, se eligió a la formulación 1 con aceite de oliva como la mejor formulación de crema fotoprotectora para la realización de las posteriores pruebas pertinentes a esta investigación.

Tabla 15-3. Formulación 1 de elección que contiene aceite de oliva al 100%.

Ingredientes	Formulación 1 con aceite de oliva (%)	Cantidad límite, FDA (%)	Propiedades
Cera de abeja	6,7	3,5	Efecto oclusivo, aumenta la viscosidad
Ácido esteárico	6,7	22	Efecto evanescente, coemulgente
Alcohol cetílico	5	6	Emoliente, oclusivo y coemulgente
Glicerina	4,3	4	Humectante
Manteca de cacao	3,3	N/A	Emoliente
Aceite de oliva	10	27	Emoliente, lubricante, antioxidante
Estereato de sacarosa	3,3	7	Tensioactivo
Vitamina E	0,02	0,002	Antioxidante
Metil-parabeno	0,15	0,15	Conservante
Extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>	19,3		Fotoprotector y antioxidante
Agua destilada	csp 100g		Vehículo (solvente universal)

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

3.11.2 Ensayo de irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

Tabla 16-3. Resultados del método CAM-TBS de la crema fotoprotectora con extracto etanólico de *Bidens andicola*

Control	Tipo de control	Promedio de la cantidad de colorante absorbido (CA)	Clasificación
Agua destilada	Control negativo	0	No irritante
Hidróxido de sodio 0,1 M	Control positivo	0,150±0,025	Irritante moderado
Crema fotoprotectora	crema	0	No irritante

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

A través del ensayo CAM-TBS se determinó la cantidad de colorante absorbido (CA) de la crema fotoprotectora de *Bidens andicola* a una concentración de 1345ppm que fue de 0, al igual que el agua destilada que se utilizó como control negativo, valores que se compararon con un estudio bibliográfico realizado por García, et al. (2004), quienes establecieron la categoría de irritación según la cantidad de colorante absorbido, de esta manera se clasificó a la crema fotoprotectora y al agua destilada como no irritantes, ya que se encontraron dentro del rango de <0,100 nmoles/mg. Datos que corroboran con los resultados obtenidos de la prueba HET-CAM realizada anteriormente donde se clasificó como no irritante al extracto etanólico de *Bidens andicola*. De esta manera se demostró que la crema fotoprotectora no ocasionó ningún daño en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, evitando así que el colorante azul de tripán se absorba por las células de dicha membrana. Por lo tanto, al ser CAM-TBS un ensayo complementario al ensayo HET-ACM, se determinó que la crema fotoprotectora de *Bidens andicola* es segura para ser aplicada en la piel de las personas.

Mientras que el hidróxido de sodio 0,1 M presentó un valor de CA de 0,150, el cual se categorizó como irritante moderado ya que se encontró dentro del rango de 0,100 a 0,150 nmoles/mg que, valor que fue similar al comparar con Reis, et al. (2016) donde indica que el NaOH 0,1M se utiliza como control positivo para el ensayo CAM.TBS. Lo cual demuestra que este ensayo se realizó de manera correcta.

3.11.3 Evaluación de las características organolépticos de la crema fotoprotectora

Tabla 17-3. Resultados de evaluación de las características organolépticas de la crema fotoprotectora

Características organolépticas	Crema fotoprotectora de <i>Bidens andicola</i>
Olor	Lavanda-limón
Color	Amarillo pastel
Aspecto	Crema homogénea
Presencia de grumos	Negativo

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Mediante la evaluación de las características organolépticas de la crema fotoprotectora con extracto etanólico de *Bidens andicola* se determinó un olor agradable a lavanda-limón, un color amarillo pastel, un aspecto homogéneo y no se observó la presencia de grumos. Características organolépticas que fueron similares al comparar con un estudio realizado por Orozco Verónica (2013) quien elaboró un protector solar a través extractos vegetales. Por lo tanto, se demostró que la crema fotoprotectora de *Bidens andicola* se preparó de manera correcta siendo de esta manera agradable ante la vista de las personas.

3.11.4 Parámetro Físico

Tabla 18-3. Resultado de los parámetros físicos de la crema fotoprotectora

Parámetro	Crema fotoprotectora de <i>Bidens andicola</i>	Especificación
pH	5,5	5,5 – 5,9

Realizado por: Diana Pacheco, 2018.

Mediante la evaluación del parámetro físico que se realizó a la crema fotoprotectora con extracto de *Bidens andicola* se determinó un pH de 5,5, valor que se encuentra dentro de los límites

establecidos por la USP. Además, el valor de pH obtenido fue similar al pH de la piel (5,0 a 5.5) de los seres humanos, que, al comparar con un estudio bibliográfico realizado por Sordo, et al. (2013) indica que un producto cosmético de aplicación tópica debe presentar un pH similar al pH de la piel, ya que si presenta un valor de pH mayor o menor puede ocasionar alteraciones en el sistema defensivo de la piel dando lugar a la aparición de manchas, acné, dermatitis seborreica, entre otras patologías. Por lo tanto, se determinó que la crema fotoprotectora de *Bidens andicola* se considera adecuada para la aplicación en la piel de las personas y además ayuda a mantener el sistema de defensa de la piel en condiciones óptimas evitando el ataque de microorganismos.

CONCLUSIONES

1. El control de calidad de la droga cruda, seca y triturada de las partes aéreas de *Bidens andicola* determinó que cumple con los parámetros de calidad establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (2008), considerándose apta para su estudio. Así también a través del tamizaje fitoquímico se comprobó la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en las partes aéreas de *Bidens andicola*, siendo éstos los metabolitos secundarios responsables de la actividad fotoprotectora.
2. La determinación del factor de protección solar se realizó mediante la aplicación de la Ecuación de Mansur para los siguientes extractos: etanólico al 96% sin desengrasar, etanólico al 96% desengrasado, hidroalcohólico al 70% y con acetato de etilo. Siendo de elección el extracto etanólico al 96% sin desengrasar de *B. andicola* con un FPS de 23 a una concentración de 600 ppm.
3. Las formulaciones de cremas fotoprotectoras con extracto etanólico de *Bidens andicola* a 1345ppm, se preparó con un 98% de ingredientes naturales incluido el agua y 2% de sustancias químicas como el conservante y el perfume, diferenciándose cada formulación por el tipo de aceite que contenía.
4. La formulación con aceite de oliva se seleccionó como la mejor crema fotoprotectora ya que presentó el valor más alto de FPS de 23, demostrando que este tipo de formulación dio lugar a la interacción entre los compuestos del extracto etanólico *Bidens andicola* con los compuestos que posee el aceite de oliva creando así un efecto sinérgico.
5. Los resultados del control de calidad de la crema fotoprotectora de *Bidens andicola* demostraron que es eficaz e inocua a nivel tópico, ya que cumplen con las pautas de evaluación de eficacia de los productos cosméticos establecidos por COLIPA (2008).

RECOMENDACIONES

- Complementar el control de calidad de la crema fotoprotectora con las pruebas de estabilidad, pruebas reológicas y microbiológicas para garantizar su efectividad.
- Realizar estudios de toxicidad y genotoxicidad tanto del extracto etanólico de *Bidens andicola* como de la crema fotoprotectora, para que puedan ser utilizados en la industria cosméticas.
- Establecer el etiquetado de la crema fotoprotectora según la Norma de COLIPA – Directrices sobre Etiquetado de Productos Cosméticos, 2011.
- Impulsar el desarrollo de estudios farmacognósticos y fitoquímicos de las especies vegetales andinas del Ecuador, especialmente de aquellas que poseen actividad fotoprotectora y antioxidante con la finalidad de elaborar e innovar productos fitocosmecéuticos que sea de gran utilidad terapéutica para prevenir, tratar o paliar enfermedades en los seres humanos y de esta manera contribuir al “Buen vivir” Sumak Kawsay.

BIBLIOGRAFÍA

AL-JAMAL, M.S., GRIFFITH, J.L. y LIM, HW. Photoprotection in ethnic skin. *Dermatologica Sinica*. 2014 vol. 32, no. 4, pp. 217-224. ISSN 2223330X. DOI 10.1016/j.dsi.2014.09.001.

ALCALDE, M.T.,. *Cosmética natural y ecológica*, 2008 , vol. 27.

ALTAMIRANO, S., 2015. National Cancer Registry, vol 12.

ARTEAGA, S. y PAZMIÑO, K. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Facultad de Medicina Director: [en línea], 2013 pp. 2014-2015. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/5882>.

AUTÓNOMO, G. y MUNICIPAL, D., Saquisilí. [en línea], 2014., Disponible en: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/DOCUMENTO_DIAGNOSTICO_PDyOT_DEL_CANTÓN_SAQUISILÍ_15-11-2014.pdf.

BALLESTEROS BENAVIDES, H.O. Información técnica sobre la radiación ultravioleta, el índice UV y su pronóstico. *Ideam-Meteo* [en línea], 2010 Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/022454/NotatecnicaIUVPaginaWEBfinal.pdf>.

BARRERA, A. Evaluación de la Actividad Fotoprotectora de la hoja de *Zea Mays.*, [en línea], 2017 Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6838/1/56T00727.pdf>

BOUKHRIS, M., SIMMONDS, M.S.J., SAYADI, S. y BOUAZIZ, M. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, pelargonium graveolens. *Phytotherapy Research*, 2013, vol. 27, no. 8, pp. 1206-1213. ISSN 0951418X. DOI 10.1002/ptr.4853.

CESTARI, T.F., OLIVEIRA, F.B. de y BOZA, J.C. Considerations on photoprotection and skin disorders. *Annales de dermatologie et de vénéréologie* [en línea], 2012, vol. 139 Suppl, pp. S135-S143. ISSN 01519638. DOI 10.1016/S0151-9638(12)70125-4. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0151-9638\(12\)70125-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0151-9638(12)70125-4).

COLIPA GUIDELINES ON COSMETIC. Colipa Guidelines on Cosmetic. [en línea], 2011. Disponible en: http://www.ixpos.de/IXPOS/Content/EN/Your-business-in-germany/_SharedDocs/Downloads/guidelines-cosmetic-labeling-cosmetics-europe.pdf?v=3.

COLIPA THE EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. Serious about Cosmetics - Serious about Alternative Methods. *Colipa* [en línea], 2005. Disponible en: WWW.COSMETICSEUROPE.EU.

COSTA, S.C.C., DETONI, C.B., BRANCO, C.R.C., BOTURA, M.B. y BRANCO, A. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2015, vol. 25, no. 4, pp. 413-418. ISSN 0102695X. DOI 10.1016/j.bjp.2015.07.013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.013>.

CRAYTHORNE, E. y AL-NIAMI, F. Skin cancer. *Medicine (United Kingdom)* [en línea], 2017, vol. 45, no. 7, pp. 431-434. ISSN 13654357. DOI 10.1016/j.mpmed.2017.04.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.04.003>.

DE OLIVEIRA JUNIOR, R.G., ARAÚJO, C. de S., SOUZA, G.R., GUIMARÃES, A.L., DE OLIVEIRA, A.P., DE LIMA-SARAIVA, S.R.G., MORAIS, A.C.S., DOS SANTOS, J.S.R. y ALMEIDA, J.R.G. da S. In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [en línea],

2013, vol. 3, no. 1, pp. 122-127. ISSN 22313354. DOI 10.7324/JAPS.2013.30124. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Raimundo_Oliveira_Junior2/publication/265123743_In_vitro_antioxidant_and_photoprotective_activities_of_dried_extracts_from_Neoglaziovia_variegata_Bromeliaceae/links/53ff48290cf2a8d24bc1b17d/In-vitro-antioxidant-and-pho.

DE SEVILLA, U. El Color Y La Edad De La Piel: El Fotoenvejecimiento. [en línea], 2017. Disponible en: https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/66485/Gómez_González%2C_Mercedes.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

DE TOMMASI, N., PIACENTE, S. y PIZZA, C. Flavonol and chalcone ester glycosides from *Bidens andicola*. *Journal of Natural Products*, 1998, vol. 61, no. 8, pp. 973-977. ISSN 01633864. DOI 10.1021/np970470f.

DURO MOTA, E., CAMPILLOS PÁEZ, M.T. y CAUSÍN SERRANO, S. El Sol y los Filtros Solares. *Revista de Medicina Familiar y Comunitaria* [en línea], 2003, vol. 13, pp. 159-165. ISSN 11315768. DOI 10.4321/S1131-57682003000300005. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/medif/v13n3/hablemos1.pdf>.

ECOCERT, N. Norma Ecocert. [en línea], 2012. Disponible en: <http://www.ecocert.es/sites/default/files/u3/Norma-Ecocert.pdf>.

EPIDEMIOLOGY, C. y QUITO, I.N. *REGISTRO NACIONAL DE TUMORES / NATIONAL CANCER REGISTRY* [en línea], 2010, S.l.: s.n. ISBN 9789942995827. Disponible en: <http://www.estadisticas.med.ec/Publicaciones/PUBLICACION-QU-2006-2010.pdf>.

ESPA, R. Los métodos alternativos a la experimentación animal ante las nuevas normativas internacionales. [en línea], 2009. Disponible en: http://www.remanet.net/Nueva_carpeta2/09_Industria_cosmetica_stanpa3.pdf.

ESTEVA, E. Fotoprotección. , vol. 24, 2005.

EVELYNG, B., ROSARIO, D. y ESPINOZA, T. Estandarización y validación del método HET CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética. [en línea], 2015. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4474/1/Taype_ee.pdf.

FDA. *Index @ Www.Accessdata.Fda.Gov* [en línea]. 2018. S.l.: s.n. Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm.

GARCÍA, L., GLEIBY, M., OCA, M. De y HIDALGO, N. Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var . *catenulata*, 2004.

GILABERTE, Y. y GONZÁLEZ, S. Novedades en fotoprotección. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 2010, vol. 101, no. 8, pp. 659-672. ISSN 00017310. DOI 10.1016/j.ad.2010.04.003.

GIRALDO, J.C.M., ATEHORTÚA, L. y MEJÍA, M.Á.P. Foto-protección: Mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatologia Cosmetica, Medica y Quirurgica* [en línea], 2014, vol. 12, no. 4, pp. 272-281. ISSN 16654390. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm144i.pdf>.

GONZÁLEZ, M. y CASTRO, I. El sol: ¿enemigo de nuestra piel? *Medisan* [en línea], 2010, vol. 14, no. 6, pp. 825-837. ISSN 1029-3019. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192010000600014&lang=es.

HELENA, L. y CHAPARRO, F. *Cosméticos*, 2010.

HUANG, S.H. y NG, L.T. Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of Food Composition and Analysis* [en línea], 2012, vol. 26, no. 1-2, pp. 122-127. ISSN 08891575. DOI 10.1016/j.jfca.2012.03.009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2012.03.009>.

INOCENTE CAMONES, M.A., TOSCANO GUERRA, E.M. y CASTAÑEDA CASTAÑEDA, B. Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu , mediante el método Het Cam . *Horiz Med* [en línea], 2013, vol. 13, no. 2, pp. 12-18. ISSN 2227-3530. Disponible en: http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2013_2/Art2_Vol13_N2.pdf.

KIELLHOFNER, G. *Books @ Books.Google.Es* [en línea]. 2011. S.l.: s.n. ISBN 978-0-631-19241-1. Disponible en: [https://books.google.es/bookshl=es&lr=&id=hBQfhHCs-XIC&oi=fnd&pg=PA15&dq=Modelo+de+Ocupacin+Humana+\(MOHO\)+&ots=z_EewiJFXs&sig=4x3x1SzFB6X8Y41Kqq67udMZz-M#v=onepage&q=Modelo de Ocupacin Humana \(MOHO\)&f=false](https://books.google.es/bookshl=es&lr=&id=hBQfhHCs-XIC&oi=fnd&pg=PA15&dq=Modelo+de+Ocupacin+Humana+(MOHO)+&ots=z_EewiJFXs&sig=4x3x1SzFB6X8Y41Kqq67udMZz-M#v=onepage&q=Modelo de Ocupacin Humana (MOHO)&f=false).

LAGUNA, C., CUADRA, J. De, ZARAGOZA, V. y ALEGRE, L.M. V. Dermatitis alérgica de contacto por cosméticos, 2009 , pp. 53-60. DOI 10.1016/S0001-7310(09)70057-2.

LECHA-CARRALERO, M. Fotoprotección : los filtros solares. *Terapeutica*, 2004, vol. 67, no. 1529, pp. 562-564.

LILLINI, G., PASQUALI, R., PEDEMONTE, C., BREGNI, C. y LAVASELLI, S. Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas , y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble : Econazol. *Rev. Colomb.Quím.Farm*, 2016, vol. 45, no. 1, pp. 5-20. ISSN 1909-6356. DOI 10.15446/rcciquifa.v45n1.58011.

LOPEZ, R. Guía para el uso y elección de protectores solares y componentes para la industria cosmética y consumidores finales, 2012, pp. 113.

LÓPEZ ROMO, E.B. Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotoxicidad in vitro de *Bidens andicola*. *Facultad de Ciencias* [en línea], 2016, vol. Bachelor, pp. 113. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5795/1/56T00667.pdf>.

LUCERO, M.J. El pH de la piel y los productos cosméticos. [en línea], 2017, pp.

<https://www.invima.gov.co/images/pdf/Prensa/public>. Disponible en:
<http://www.portalfarma.com/jornadas-congresos/4a-Jornada-Nacional-Dermofarmacia/Documents/2017-JNA-Conferencia-MJesus-Lucero-pH-piel-productos-cosmeticos.pdf>.

MANTECA MARTÍN. Biología de la piel y cáncer. [en línea], 2013, pp. 33. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/2204/MantecaMartinA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

MARIS, S., INGRATTA, B., BEATRIZ, L., GRISELDA, M. y CASERIO, M. Dermatología, 2003.

MARTÍNEZ, S. El sol y la piel. Fotodermatosis. *Rev Cent Dermatol Pascua*, 2000, vol. 9, no. 2, pp. 126-136.

MIRANDA MIGDALIA. *Folleto Completo Farmacognosia*. 1992. S.l.: s.n.

MOUDACHE, M., COLON, M., NERÍN, C. y ZAIDI, F. Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing Olive Leaf extract. *Food Chemistry* [en línea], 2016, ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.06.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.001>.

OLARTE, M., SÁNCHEZ, S.H., ARECHIGA, C.F., BAÑUELOS, R., RAMÍREZ, E. y L, A.L. Daño y respuesta celular en piel por exposición prolongada a radiación UV. *Revista ANACEM* [en línea], 2016, vol. 9, no. 2, pp. 44-52. Disponible en: <http://www.revistaanacem.cl/wp-content/uploads/2016/11/10.-2015-9-1-AR1.pdf>.

OLMOS, S.S. EMULSIONES (I), 2017, Vol. I, pp. 1-9.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Índice UV solar mundial: guía práctica. [en línea], 2003, pp. 28. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42633/1/9243590073.pdf?ua=1>.

OROZCO MONTERO, V.P. y ABDO, S. Actividad Fotoprotectora del Taxo (*Passiflora tripartita*) y Albahaca (*Ocinum basilicum*), en fototipos III (*Homo sapiens*) para la Elaboración de un Protector. *Facultad de Ciencias* [en línea], 2013, vol. Bachelor, pp. 132. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2564>.

REIS MANSUR, M.C.P.P., LEITÃO, S.G., CERQUEIRA-COUTINHO, C., VERMELHO, A.B., SILVA, R.S., PRESGRAVE, O.A.F., LEITÃO, Á.A.C., LEITÃO, G.G., RICCI-JÚNIOR, E. y SANTOS, E.P. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2016, vol. 26, no. 2, pp. 251-258. ISSN 0102695X. DOI 10.1016/j.bjp.2015.11.006. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.11.006>.

SAÉZ, M. y OROZCO, M.L. Protección solar en el paciente pediátrico. *Acta pediátrica de México* [en línea], 2014, vol. 35, no. 6, pp. 448-458. ISSN 0186-2391. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912015000400009%0Ahttp://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912014000600003&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

SAMANIEGO RASCÓN, D., FERREIRA, A.D. y GAMEIRO DA SILVA, M. Cumulative and momentary skin exposures to solar radiation in central receiver solar systems. *Energy* [en línea], 2017, vol. 137, pp. 336-349. ISSN 03605442. DOI 10.1016/j.energy.2017.02.170. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2017.02.170>.

SANFORD, J.A. y GALLO, R.L. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in Immunology* [en línea], 2013, vol. 25, no. 5, pp. 370-377. ISSN 10445323. DOI 10.1016/j.smim.2013.09.005. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.005>.

SOARES DOS REIS, G., FURTADO VALADADO y LIMA, ANALINA , RAMOS PAES DE MOREIRA, LEONARDO, LUCY MOREIRA, M. Preparation of a sunscreen and evaluation of the photoprotective action of the green propolis from Vale do Aço, Minas Gerais, Brazil. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2009, vol. 8, no. 4, pp. 282-288. ISSN 07177917.

TAPIA, A.G. Indicaciones y aplicaciones de la fotoprotección. *Revista de la educación superior* [en línea], 2018, vol. 12, no. 47, pp. 2811-2814. ISSN 0304-5412. DOI 10.1016/j.med.2017.12.009. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.med.2017.12.009>.

TINAJERO ROBALINO, M.D. y CONTERO, F. Estudio Fitoquímico y evaluación de la actividad fotoprotectora IN-VITRO del componente Flavónico presente en *Bidens Andicola* (Ñachag). *Facultad de Ciencias* [en línea], 2015, vol. Bachelor, pp. 90. Disponible en: <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/4012>.

TOHIDI, B., RAHIMMALEK, M. y ARZANI, A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry* [en línea], 2017, vol. 220, pp. 153-161. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.09.203. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.203>.

VERÓNICA ELIZABETH MORA CHUNLLO. Full-Text. “*Diseño E Implementación De Un Modelo Software Basado En Técnicas De Inteligencia Artificial, Para Predecir El Índice De Radiación*” [en línea], 2015, pp. 157. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/12216/1/T-ESPEL-MAS-0027.pdf>.

VILLEGAS, E.D. de, MENÉNDEZ, M.D.C., MARTÍNEZ, M.S., ALONSO, M.C. y VIERA, N.R. Radiación ultravioleta. Fotoenvejecimiento cutáneo. *Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos* [en línea], 2005, vol. 3, no. 1, pp. 14-33. ISSN 1727-897X. Disponible en: <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/97>.

VINUEZA, D.R., LÓPEZ, E., ACOSTA, K. y ABDO, S. Assessment of anti-inflammatory activity and cytotoxicity of freeze dried hydroalcoholic extract of *Bidens andicola* on isolated neutrophils. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* [en línea], 2017, vol. 10, no. 6, pp. 160-163. ISSN 24553891. DOI 10.22159/ajpcr.2017.v10i6.17574. Disponible en: <http://gipronaf.com/wp-content/uploads/2017/05/2017.pdf>.

ZARAGOZANO, J.F., LOZANO, M.B. y AZNAR, L.M. Quemadura solar y fotodermatitis, 2016, vol. 1, pp. 48-58.

ANEXOS

Anexo A: Evidencias fotográficas de la investigación.

Recolección y secado del material vegetal	Control de calidad del material vegetal
	
Tamizaje fitoquímico extracto etéreo	Tamizaje fitoquímico extracto alcohólico
	
Tamizaje fitoquímico extracto acuoso	Medición del Factor de protección Solar de los diferentes extractos de <i>Bidens andicola</i>
	

Control de calidad de extracto etanólico al 96% de <i>Bidens andicola</i>	Prueba de irritación ocular HET-CAM del extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i>
	
<p>Evaluación del efecto del agua destilada (control negativo) en la CAM. Izquierda y el efecto con la adición de hidróxido de sodio (control positivo). Derecha se observa hemorragia, lisis y coágulos.</p>	
	
<p>Evaluación mediante el método HET-CAM del extracto etanólico de <i>Bidens andicola</i> a concentraciones de 250, 500 y 1345ppm.</p>	
	

Formulaciones de cremas fotoprotectoras con extracto *Bidens andicola*. Formulación 1 con aceite de oliva, formulación 2 con aceite de aguacate, formulación 3 con aceite de coco y formulación 4 con aceite de girasol.



Medición del FPS de las cremas fotoprotectoras

Formulación de elección: Formulación 1 con aceite de oliva



Ensayo de irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS) de la crema fotoprotectora.

