



Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Instituto de Investigaciones
Sección Biotecnología



Estudio de fotosensibilidad, fotoprotección y Actividad Biológica de los extractos etanólicos de flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad.

Trabajo de Grado, requisito para optar al título de Licenciada en Bioanálisis.

Autor: Claudijes Del Valle López R.

Tutor: Prof. Juan Dávila

Cotutor: Prof. Efrén Andrades

Octubre de 2014

Mérida – Venezuela

Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Instituto de Investigaciones
Sección Biotecnología

ESTUDIO DE FOTOSENSIBILIDAD, FOTOPROTECCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE FLORES Y HOJAS DE LA PLANTA *BIDENS PILOSA* L. PREPARADOS EN LA OSCURIDAD.

Trabajo de grado presentado ante la ilustre Universidad de Los Andes para optar al título de Licenciada en Bioanálisis.

Este fue realizado en la sección de Biotecnología del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la tutoría de los Profesores: Juan Dávila y Efrén Andrades.

Autor: Claudijes Del Valle López Ramos

Tutores: Juan Dávila y Efrén Andrades

Índice general

Índice general	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	vi
Índice de gráficas	vii
Dedicatoria	x
Agradecimientos	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Introducción	1
Capítulo I. El problema a investigar	
Planteamiento del problema	3
Formulación del problema	4
Objetivos de la investigación	
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Justificación	6
Capítulo II. Marco teórico	
Antecedentes de la investigación	7
Trabajos publicados en revistas internacionales	7

Trabajos realizados en el Instituto de Investigación	11
Bases teóricas	14
Fotosensibilizadores	14
Fotoprotección	14
Fotoprotectores	15
Radiación ultravioleta	20
Terapia fotodinámica	24
Cromatografía	25
Espectrofotometría	26
Extractos	27
<i>Bidens pilosa</i> L.	30
Hipótesis	39
Capítulo III. Marco metodológico	
Enfoque de la investigación	40
Nivel de la investigación	41
Diseño de la investigación	41
Población y muestra	42
Materiales y métodos	42
Materiales	43
Métodos	44

Estrategias para la recolección de las muestras	44
Preparación de los extractos	47
Espectrofotometría: ensayo de fotosensibilidad	53
Cromatografía en capa fina	53
Actividad biológica y fotoprotección	54
Capítulo IV. Resultados y Discusiones	
Resultados de fotosensibilidad evaluados por espectrofotometría	58
Resultados de la cromatografía	71
Determinación de las actividades biológicas (fotoprotección-UV y fototoxicidad) de los extractos etanólicos, etanólicos secos y resuspendidos en agua, de la flores y hojas de <i>Bidens pilosa</i> L., sobre la cepa de <i>Escherichia coli</i> GY5027.	77
Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones	87
Referencias	90
Anexos	94

Índice de tablas

Tabla 1. Fotoprotectores y su espectro de absorción UV-A y UV-B (nm).	20
Tabla 2. Componentes aislados de extractos de <i>Bidens pilosa</i> .	37
Tabla 3. Peso de las partes de la planta 1 <i>Bidens pilosa</i> L.	46
Tabla 4. Peso de las partes de la planta 2 <i>Bidens pilosa</i> L.	46
Tabla 5. Peso de las partes de la planta 3 <i>Bidens pilosa</i> L.	46
Tabla 6. Cantidades utilizadas para la preparación de extractos etanólicos.	48
Tabla 7. Cálculo de concentración de extractos etanólico resuspendidos en agua.	51
Tabla 8. Cantidades de extractos utilizados en la cromatografía	54
Tabla 9. Referencia de las bandas cromatográficas	72
Tabla 10. Cromatografía observada en luz visible, luz UV onda corta (254 nm) y luz UV onda larga (365nm)	73
Tabla 11. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta <i>Bidens pilosa</i> L. Mantenidos en oscuridad, 2do ensayo.	79
Tabla 12. Actividad biológica de los extractos etanólicos de flor y hoja de la planta <i>Bidens pilosa</i> L resuspendidos en agua. Mantenidos en oscuridad, 3er ensayo	79
Tabla 13. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta <i>Bidens pilosa</i> L. Bajo la acción de la luz UV. 2do ensayo.	80

Tabla 14. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta <i>Bidens pilosa</i> L resuspendidos en agua. Bajo la acción de la Luz UV. 3er ensayo.	81
Tabla 15. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta <i>Bidens pilosa</i> L. Bajo la acción de la Luz blanca. 2do ensayo.	82
Tabla 16. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta <i>Bidens pilosa</i> L. resuspendidos en agua. Bajo la acción de la luz blanca. 3er ensayo.	82

www.bdigital.ula.ve

Índice de figuras

Figura 1. <i>Bidens pilosa</i> L. planta entera	31
Figura 2. Flor de la planta <i>Bidens pilosa</i> L.	32
Figura 3. Flores, hojas y tallos de la planta <i>Bidens pilosa</i> L	32
Figura 4. Materiales utilizados en la parte experimental.	43
Figura 5. Ubicación satelital de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis	45
Figura 6. Bagazo de flores y hojas.	52
Figura 7. Placa de petri dividida para los ensayos.	55
Figura 8. Plantilla para protección de sectores irradiados con luz UV y luz blanca.	57
Figura 9. Cromatografía de los extractos etanólicos de flores y hojas observados en luz visible.	75
Figura 10. Cromatografía de los extractos etanólico de flores y hojas observados en luz UV onda corta (254nm).	76
Figura 11. Cromatografía de los extractos etanólicos de flores y hojas observados en luz UV onda larga (365nm).	76
Figura 12. Primer ensayo, extracto etanólico puro. Sin crecimiento bacteriano	83
Figura 13. Segundo ensayo, extracto etanólico evaporado. En oscuridad.	84
Figura 14. Tercer ensayo, extracto etanólico resuspendido en agua. En oscuridad.	84

Figura 15. Segundo ensayo. Extracto etanólico evaporado de flor y hoja. En Oscuridad, bajo luz UV y luz blanca. 84

Figura 16. Tercer ensayo. Extracto etanólico de flor y hoja resuspendido en agua. En Oscuridad, bajo luz UV y luz blanca 85

Figura 17. Segundo ensayo, extracto etanólico evaporado. Bajo la acción de luz UV. 85

Figura 18. Tercer ensayo, extracto etanólico de flor y hoja resuspendido en agua. Bajo la acción de luz UV. 85

Figura 19. Segundo ensayo, extracto etanólico evaporado de flor y hoja. Bajo la acción de luz blanca 86

Figura 20. Tercer ensayo, extracto etanólico de flor y hoja resuspendido en agua. Bajo la acción de luz blanca. 86

www.bdigital.ula.ve

Índice de gráficas

GRÁFICA 1. Espectro ascendente, descendente, resta y división, de los extractos etanólicos de flor.	59
GRÁFICA 2. Extracto etanólico de flor (Espectro Ascendente y Descendente de 190 a 390nm)	60
GRÁFICA 3. Extracto etanólico de flor. Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes (190 a 390nm).	60
GRÁFICA 4. Extracto etanólico de flor. División de los espectros Ascendentes-Descendentes (190 a 390nm).	61
GRÁFICA 5. Extracto etanólico de flor (Ascendente de 190-220nm)	62
GRÁFICA 6. Extracto etanólico de flor (Ascendente de 220-280nm)	62
GRÁFICA 7. Extracto etanólico de flor (Descendente de 190-220nm)	63
GRÁFICA 8. Extracto etanólico de flor (Descendente de 220-280nm)	63
GRÁFICA 9. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor. (190-220nm)	64
GRÁFICA 10. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor. (230-280nm)	65
GRÁFICA 11. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor (190-220nm)	66
GRÁFICA 12. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor (220-280nm)	66

GRÁFICA 13. Espectros ascendente y descendente. Extracto etanólico de hoja (190-390nm).	67
GRÁFICA 14. Espectros diferenciales (Resta y división). Extracto etanólico de hoja (190-390).	67
GRÁFICA 15. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de hoja (190-220nm).	68
GRÁFICA 16. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de hoja (240-290nm).	68
GRÁFICA 17. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de la hoja (190-220nm).	69
GRÁFICA 18. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de la hoja (240-290nm).	69
GRÁFICA 19. Espectro ascendente. Extracto etanólico de hoja (400-700 nm).	70
GRÁFICA 20. Espectro ascendente. Extracto etanólico de hoja (500-600 nm).	71

Dedicatoria

A Dios y mi Virgen Del Valle, mis guías espirituales.

A mi amada América López, mi Ángel guardián, mi luz.

A mis padres Jesús López y Claudia De López, mis pilares, que con amor me enseñaron los valores necesarios para vivir con anhelo y felicidad, esto es de ustedes...

A mis hermanas Adriana López, Acirema López y a mi hermanito Jesús López son parte de mi vida, gracias a Dios por concederme la dicha de tener a estos maravillosos seres como hermanos.

A mis abuelos Jesús López, Adriana De López, Juana López y Andrés Ramos, Los amo.

A mis tías Yolanda López Y Juana López, mis madres de corazón.

A mis queridos Primos, Amelexis, Alexis, Juan Antonio y Luis Adrian, mis segundos hermanos.

A toda mi familia y amigos, con los que he compartido grandes momentos.

Este logro se los dedico.

Agradecimientos

A Dios, mi Virgen Del Valle y mi Ángel Guardián, mi querida y siempre recordada tía America López, por guiar mis pasos a lo largo de este camino.

A mis padres Jesús López y Claudia de López por confiar en mi, por su gran apoyo desde el inicio de mi carrera y durante toda mi vida, amados padres hoy esto es posible gracias a ustedes.

A mis abuelos, Jesús López y Adriana de López, mis segundos padres, por todo su amor incondicional y sus grandes enseñanzas.

A mis hermanas Adriana López, Acirema López y a mi hermanito Jesús López por siempre estar cuando los necesito y ser mi inspiración para hacerlo cada vez mejor.

A mis Tías Yolanda López y Juana López por toda la ayuda que me han brindado durante mi vida y mi carrera, crecí con ustedes y parte de lo que soy se los agradezco.

A la Universidad De Los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por abrirme sus puertas y formarme como profesionales.

El Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por permitirme utilizar sus instalaciones y el material necesario para la elaboración de este proyecto, contribuyendo con mi formación académica, y por supuesto a todos los profesores de la sección de Biotecnología por su colaboración de alguna u otra manera.

A mis queridos tutores el Prof. Efrén Andrades y la Prof. Cristina Grassi por toda la colaboración que me brindaron para la culminación de este proyecto, gracias a ustedes hoy se cierra esta importante etapa de mi vida.

A mi tutor el Prof. Juan Dávila por su ayuda en el inicio de este proyecto y por dejarme en excelentes manos.

A José Vizcaíno, mas que un amigo, mi gran apoyo en todo momento.

A mi amigo Jaines Zabala por toda su colaboración desde el inicio de mi carrera, a mis amigas y colegas Jhosianny Boadas, Nelsy Cisneros, Mariana Briceño, Paola Terán, Génesis Vásquez y Karen Noguera, por todo su apoyo brindado desde que empezamos este hermoso camino. Tuve la dicha de tener el mejor grupo.

Para todos ustedes, muchas gracias...

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Bioanálisis

ESTUDIO DE FOTOSENSIBILIDAD, FOTOPROTECCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE FLORES Y HOJAS DE LA PLANTA *Bidens pilosa* L. PREPARADOS EN LA OSCURIDAD.

Autor: Claudijes Del Valle López Ramos

Tutores: Juan Dávila/Efrén Andrades

Resumen

En el presente trabajo se evalúa el efecto de fotosensibilidad, fotoprotección y actividad biológica sobre la cepa *Escherichia coli* GY 5027, de extracto etanólico de flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad, las plantas fueron recolectadas a 1.600 m.s.n.m, e inmediatamente fueron protegidas de la luz en bolsas negras. Las partes de la planta fueron separadas, pesadas y extraídas inmediatamente, macerando la muestra en volúmenes medidos de etanol, los extractos fueron analizados espectrofotométricamente, cromatográficamente, se evaluaron para verificar su actividad biológica y su capacidad de fotoprotección o activación fototóxica. La espectrofotometría se realizó confrontando una dilución del extracto de la flor y de la hoja con la luz del monocromador en el sentido ascendente de 190 a 390 nm y de manera descendente de 390 a 190 nm para detectar alguna distinción en la absorción debida al diferencial de irradiación, el extracto de la hoja se ensayó, a su vez, en la región visible ascendente de 400 a 700 nm. En el caso del extracto de la flor, los resultados indican que hay una molécula fotosensible que absorbe a 190 nm y otra a 201 nm. La absorción directa en la región UV tanto ascendente como descendente pone en evidencia varios picos y valle entre 220-280 nm que además presentan en los efectos diferenciales un corrimiento hipsocrómico que puede estar reflejado en el resultado del bandeo cromatográfico, revelado por la onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm). Se encontró una actividad biológica tóxica cuando se usan los extractos etanólicos de la hoja y de la flor colocados directamente sobre la bacteria; dicha toxicidad se puede atribuir al etanol. Se encontró actividad de fotoprotección en el extracto de la flor resuspendido en agua. El extracto etanólico de la flor y de la hoja evaporado previamente (sin el etanol) fotoprotegen contra la luz UV. Concluimos que los extractos de la flor de *Bidens pilosa* L. contienen un conjunto de compuestos relacionados entre sí que permiten monitorear la irradiación UV de 220 a 280nm.

Palabras claves: *Bidens pilosa* L., Extracto etanólico, Fotosensibilidad, Fotoprotección.

STUDY PHOTSENSITIVITY, PHOTOPROTECTION AND BIOLOGICAL
ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACTS OF FLOWERS AND LEAVES
PLANT *Bidens pilosa* L. PREPARED IN THE DARK.

Author: Claudijes Del Valle López Ramos

Tutors: Juan Dávila / Efrén Andrades

Abstract

In this paper the effect of photosensitivity, photoprotection and biological activity on *Escherichia coli* strain GY 5027, ethanolic extract of flowers and leaves of the plant *Bidens pilosa* L. prepared in the dark, is evaluated plants were harvested at 1,600 meters , and immediately were protected from light in black bags . Plant parts were removed , weighed and immediately extracted , macerating the sample measured volumes of ethanol , the extracts were analyzed spectrophotometrically chromatographically were evaluated to verify its biological activity and its ability to photoresist or phototoxic activation. Spectrophotometry was performed by comparing a dilution of the extract of the flower with the light of the monochromator in the upstream of 190-390 nm and in descending order of 390-190 nm to detect any distinction in differential absorption due to irradiation, the extract leaf was tested only in the visible region upstream from 400 to 700 nm. In the case of flower extract, the results indicate that there is a photosensitive molecule that absorbs at 190 nm and over 201 nm. Direct absorption in the UV both upstream and downstream region reveals several peaks and valley between 220-280 nm also have differential effects in one hypsochromic shift may be reflected in the result of the chromatographic banding revealed by shortwave (254 nm) and longwave (365 nm) . A toxic biological activity was found when the ethanol extracts of the leaf and flower placed directly on the bacterium used; such toxicity may be attributed to ethanol. Photoprotection activity was found in the flower extract resuspended in water. The ethanol extract of the flower and leaf previously evaporated (no ethanol) fotoprotegen against UV light. We conclude that extracts of *Bidens pilosa* L. flower contains a set of interrelated compounds that allow monitoring the UV irradiation of 220 to 280nm.

Keywords: *Bidens pilosa* L., Ethanol extract, Photosensitivity, Photoprotection.

Introducción

Los sensibilizadores fotodinámicos son sustancias que al **absorber luz** inician reacciones fotoquímicas sobre otras moléculas sustrato. De acuerdo al tipo y nivel de acumulación de las modificaciones producidas, estas pueden ocasionar daño celular. (**Pujol, Boichichio y Rabossi, 2011**). En algunas culturas la piel bronceada es sinónimo de salud, buena forma y juventud, el uso de la radiación solar no sólo ofrece beneficios estéticos, también terapéuticos en diversas enfermedades y coadyuvante en la formación de vitamina D. Sin embargo la exposición más o menos prolongada puede producir a corto o largo plazo lesiones en la piel. En razón a ello la industria médica y cosmética consideran prioritario la prevención, educando a la población en general sobre los efectos nocivos de las radiaciones solares e indicando las medidas adecuadas de fotoprotección (**Vitale, 2002**).

Dentro de las estrategias de fotoprotección se encuentran la reducción de los tiempos de exposición, sobretodo en horas del mediodía, llevar ropas adecuadas, utilizar gorros, gafas y aplicar fotoprotectores. Según **Gilaberte, et al., 2003**, estos últimos pueden definirse como *“sustancias químicas que tienen la finalidad de proteger la estructura y preservar la función de la piel humana frente a los daños ocasionados por los rayos UV-B y UV-A”*. Es por ello que hoy día, son fundamentales aquellos que ofrecen protección de amplio espectro.

Bidens pilosa es una especie de planta perteneciente a la familia Asteraceae. Es considerada una mala hierba en algunos hábitats tropicales. Sin embargo, en algunas partes del mundo es una fuente de alimento. Es originaria de Sudamérica y tiene una distribución cosmopolita.

Según los estudios realizados por Lastra y Ponce para el año 2001 La *Bidens pilosa* L. es una hierba que muestra tanto en hojas, como en tallos y raíces un amplio espectro de acciones farmacológicas, dentro de las que sobresalen antiulcerosa, antimicrobiana, hipoglicemiante, todo lo cual demuestra la potencialidad de esta planta en Fitoterapia médica.

Particularmente, en este estudio se evaluó la fotosensibilidad, fotoprotección y actividad biológica de extractos etanólicos de *Bidens pilosa* L. Estos tratados en condiciones de oscuridad y mediante espectrofotometría arrojaron la presencia de moléculas con sensibilidad en el rango de luz estudiado (UV), así mismo se comprobó la fotoprotección y se pudo demostrar la falta de fototoxicidad de los extractos ya que los mismos no eran activados en presencia de luz blanca. Los resultados obtenidos servirán de apoyo para futuras investigaciones y sin duda alguna formará parte del patrimonio del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes (IIFFB-ULA).

Capítulo I

El problema a investigar

Planteamiento del problema

El deterioro de la capa de ozono ha provocado un incremento de la radiación ultravioleta B en la superficie terrestre, causando efectos negativos en la mayoría de las plantas y animales expuestos. En especies vegetales agrícolas se han observado daños fisiológicos, bioquímicos y morfológicos, lo que muchas veces lleva a una reducción de los rendimientos, Parra, R., & del Carmen, B. (2005).

El incremento en los niveles de radiación ultravioleta B (UV-B, 280 – 320 nm de longitud de onda) que llegan a la superficie terrestre, producto de la disminución de la concentración del ozono estratosférico es un tema de preocupación científica mundial. (Faundez y Leonor, 2004).

Por otra parte un incremento importante en los casos de cáncer de piel se viene observando, principalmente por la sobre exposición al Sol, y en concreto a la radiación ultravioleta, y los efectos adversos que ésta provoca. Entre los principales efectos inducidos por la radiación ultravioleta, se destaca el incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno y una disminución de la capacidad antioxidante de la piel, que conduce al aumento en la incidencia de lesiones pre – malignas y malignas. (Apaza Ticona, L. N. 2009).

El presente estudio tendrá como objeto evaluar la fotosensibilidad, fotoprotección y actividad biológica de los extractos etanólicos de las hojas y flores de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad.

Por lo anteriormente expuesto se plantea en esta investigación las siguientes interrogantes:

Formulación del problema

¿Presentan fotosensibilidad contra luz UV y luz blanca los extractos etanólicos de flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad?

¿Presentan fotoprotección los extractos etanólicos de flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad?

¿Presentan actividad biológica los extractos etanólicos de flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad?

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Determinar la fotosensibilidad, fotoprotección y actividad biológica de los extractos etanólicos de hojas y flores de la planta *Bidens pilosa* L. preparados en la oscuridad.

Objetivos específicos

Preparar extractos etanólicos de flor y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. en la oscuridad.

Evaluar el nivel de fotosensibilidad en luz UV y luz blanca de los extractos etanólicos de la planta *Bidens pilosa* L.

Evaluar el nivel de fotoprotección de los extractos etanólicos de la planta *Bidens pilosa* L.

Estudiar a través de bioensayos la actividad biológica de los extractos etanólicos de la planta *Bidens pilosa* L.

Justificación

En la actualidad el deterioro de la capa de ozono se ha incrementado y con ello la penetración de los rayos ultravioletas a la superficie terrestre se hacen cada vez mas intenso, la penetración de estos rayos trae consigo numerosos problemas a los diferentes seres vivos que habitan la tierra.

Debido a la problemática generada por la penetración de los rayos ultravioletas a la tierra es necesario buscar soluciones de una manera fácil y practica, es por ello que en la presente investigación se plantea el uso de la planta *Bidens pilosa* L. para determinar si esta posee fotosensibilidad ante la luz UV y luz blanca, por otra parte se desea investigar si esta ejerce algún efecto fotoprotector y actividad biológica.

La *Bidens pilosa* L. es una planta que presenta grandes propiedades, todas las partes de la planta contienen moléculas bioactivas que reaccionan en curación de diferentes enfermedades (Lastra y Ponce 2001) sin embargo no se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica que nos indique presencia de moléculas fotosensibles y de fotoprotectoras de la *Bidens pilosa* L. Es por ello que en este trabajo se utilizaron los extractos etanólicos, en la oscuridad y presumimos que los mismos pueden ser almacenados y conservados con el tiempo.

Capítulo II

Marco Teórico

Antecedentes de la investigación

Todas las investigaciones que se plantean a continuación guardan relación con el proyecto planteado, ya que buscan a través de productos naturales determinar el efecto fotoprotector, fotosensibilidad o actividad biológicas de las mismas, entre dichas investigaciones realizadas tenemos:

Trabajos publicados en revistas internacionales

Apaza, L. N. (2009). Elaboración y evaluación de una forma galénica de origen vegetal con actividad fotoprotectora. El objetivo del presente estudio fue determinar si la elaboración de los preparados galenitos a partir de estas especies vegetales, poseen efectos antioxidantes in Vitro, contra la decoloración del radical catiónico ABTS+ y efectos fotoprotectores in vivo, contra la radiación ultravioleta producido por una lámpara de luz UV sobre la piel de conejos y determinar su posible dependencia respecto a su concentración.

Parra, R., & del Carmen, B. (2005). Fotosensibilidad de plantines de pepino de ensalada (*Cucumis sativus* L.) expuestos a radiación ultravioleta del tipo B (UV-B). En esta investigación se estudio la fotosensibilidad de plantines de pepino de ensalada en los cultivares Laura, Sprint 440, Dasher II, Exocet, Poinsett 76 y Marketmore 76, expuestos a 4 intensidades de radiación ultravioleta B (0, 30,40 y 50 uW cm-2). El ensayo se realizo en invernadero utilizando lámparas Q-panel UV B 313. Los plantines se establecieron en un sistema hidropónico y desde el estado de cotiledones expandidos fueron expuestos a la

radiación UV-B, durante 4 horas diarias centradas al mediodía solar. A los 18 días de tratamiento, los plantines fueron evaluados a través de variables morfológicas y de crecimiento, acumulación de compuestos absorbentes de UV-B, clorofilas y carotenoides en las hojas. La radiación UV-B produjo cambios a nivel foliar diferentes entre los cultivares, tanto en su morfología como en su crecimiento. En los cultivares malezas sensibles hubo clorosis y enrollamiento foliar. Las concentraciones de clorofilas, carotenoides y compuestos absorbentes de UV-B incrementaron con esta radiación. A partir de estos resultados se puede concluir que los mejores indicadores de sensibilidad a la radiación UV-B son la concentración de compuestos absorbentes de UV-B, flavonoides y carotenoides, la presencia de clorosis y el enrollamiento foliar.

Faundez, F., y Leonor, N. (2004). Fotosensibilidad de plantines de maíz (*Zea mays* L.) expuestos a radiación ultravioleta del tipo B (UV-B). Dentro de este contexto, esta investigación contempló, a través de su diseño y posterior implementación, una metodología de trabajo experimental adecuada para estudios de fotosensibilidad de plantines de maíz (*Zea mays* L.) a la radiación UV-B. Se evaluó el efecto de 5 niveles de radiación ultravioleta B (0, 20, 30, 40 y 50 μWcm^{-2}) en 15 cultivares comerciales de maíz en sus primeros estados de desarrollo (plantines). El ensayo se realizó en condiciones de invernadero de vidrio y los plantines crecieron en un sistema de cultivo hidropónico utilizando placas de acetato de celulosa (método sándwich). La radiación UV-B fue incrementada utilizando lámparas Q-Panel UV-B 313, las cuales se encendieron diariamente por 4 horas centradas al medio día solar. Al término del periodo experimental, 30 días después de la emergencia de los plantines, estos se evaluaron a través de parámetros de crecimiento y desarrollo. Los resultados revelaron una sensibilidad diferencial de los cultivares de maíz a la radiación UV-B. De los 15 cultivares estudiados,

solo Kennedy fue aparentemente insensible frente a los niveles de radiación estudiados, mientras que la gran mayoría respondió de manera distinta según la intensidad de radiación aplicada y según el parámetro evaluado. No existió un patrón único de respuesta. De los parámetros analizados, los más sensibles a la radiación UV-B fueron altura de planta, área foliar, peso fresco y peso seco. Mientras, no fueron buenos indicadores de 1 Cultivares comerciales de maíz: Andar, Anjou, Cóndor, Crescendo, Ideal, INIA 140, INIA 150, Kaiser, Kennedy, Kilian, Melody, Rival, San Pablo, Simphony y Tripoli. Sensibilidad diámetro del tallo, relación peso seco de raíces/peso seco de la parte aérea (PSR/PSA), longitud de raíces y peso específico de hojas. Se observaron quemaduras foliares leves y un aumento de hojas senescentes frente al incremento de intensidad de radiación UV-B.

Tobinaga, S.; Sharma, MK.; Aalbersberg, GT.; Watanabe, K.; Iguchi, K.; Narvi, K. et al. VI (2009, 03,04). Isolation and identification of a potent anti-malarial polyacetylene and bacteria from the plant *Bidens pilosa* L.; *Plantae medical*. 75: 624-8. En su publicación titulada: Aislamiento e identificación de un poliacetileno potente contra la malaria y bacterias, de la planta *Bidens pilosa* L. señalaron que las enfermedades causadas por parásitos de la malaria y bacterias patógenas han vuelto a convertirse en una amenaza grave para la humanidad, como consecuencia de la aparición de cepas multirresistentes, lo que ha llevado a la búsqueda mundial de nueva clases de medicamentos antipalúdicos y antibacterianas eficaces, su atención se centra en la *Bidens pilosa* como planta objetivo en búsqueda de nuevos compuestos activos.

First clinical experience using chlorin derivatives in Venezuela. Cabrera H., Castro J., Grassi H. and Andrades E. Journal of Medicine and Medical Sciences (2012). El presente estudio tuvo como objetivo

establecer el fundamento para el uso de dos fotosensibilizadores e-6 basados en clorina y la introducción a la práctica clínica en nuestro país para el tratamiento de carcinoma de células basales superficiales, usando el método de terapia fotodinámica.

The effect of Photodynamic Therapy on Contiguous Untreated Tumor. Cabrera H., Castro J., Grassi H., Andrades E. and López S. Dermatol Surg (2012). Este estudio trata sobre la terapia fotodinámica, el cual es un método antitumoral que utiliza un fotosensibilizador no tóxico y luz visible para producir especies reactivas de oxígeno que destruyen células malignas. Se ha utilizado cada vez más en el tratamiento de cánceres de piel no melanoma, carcinoma de células basales en particular, proporcionando un alto grado de regresión del tumor y excelentes resultados estéticos.

Tratamiento de Carcinoma Basocelular con terapia fotodinámica sistémica. Castro, J., Cabrera, H., Grassi, C., Andrades, E. Revista Colombiana de Cancerología 2012, v16 (3). Evaluar en pacientes venezolanos, la respuesta terapéutica del Carcinoma Basocelular al ser tratados con terapia fotodinámica usando un compuesto fotosensibilizador derivado de las clorinas. Se incluyen en el estudio pacientes con Carcinoma Basocelular único o múltiple diagnosticado por histopatología en adultos, sin discriminación de sexo o localización de la lesión, a quienes se les inyectó por vía intravenosa el fotosensibilizador Photolon. Después de un tiempo de tres horas, se iluminó la zona o zonas tumorales con un diodo láser de longitud de onda de 662nm. Se trataron 43 lesiones en 16 pacientes con una respuesta favorable en todos los casos tratados, con desaparición de cualquier evidencia clínica del o los tumores, lo cual se comprobó histopatológicamente. Los pacientes no presentaron complicaciones

atribuibles al tratamiento y permanecieron en control sin evidencia de enfermedad oncológica por 24 meses.

Trabajos realizados en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, en la sección de Biotecnología para optar al título de Licenciado en Bioanálisis.

Evaluación preliminar de la fotoactivación y fototoxicidad del acíbar de plantas de Sábila. Flores, M. (2012), tutor Prof. Cristina Grassi.

De cada especie de *Aloese* obtuvo una cantidad variable de acíbar, siendo *Aloe vera* la que arroja mayor cantidad de esta sustancia y *Aloe maculata* la que arroja niveles muy bajos de acíbar.

En la extracción de los acibares se puede observar que cada especie de *Aloe* tiene un color y olor característico.

Se hizo la consideración de que el acíbar extraído en condiciones de oscuridad corresponde a la forma natural de éste en la planta.

Aloe vera contiene **Aloenin**(240nm) en la muestra sin floración que se activa con luz de alta longitud de onda; también se puede identificar **Aloesin**(293nm) que se activa con la luz de alta longitud de onda y que cambia con la floración. Los picos de 206 y de 381 á 384, no pudieron ser identificados con esta información.

En el acíbar de *Aloe arborescens* (3B) se identificó **Aloe Emodin**(221nm) y **Aloenin**(307nm) como compuestos que son sensibles a la presencia de luz (ya que están en los espectros diferenciales de 3B). También se encontró un corrimiento de 206 á 221nm en oscuridad y luz respectivamente lo que indica que éstos corresponden a **Aloe Emodin** el cual ha sido reportado a 221nm pero que en oscuridad tiene una absorción de 206nm. Los picos de 275 y 375nm no fueron identificados pero el pico de 306nm debe corresponder a **Aloenin**.

Aloe maculata presenta un pico de **Aloenin** (245-251nm) que aparece con la luz. También se encuentra el pico de **Aloenin** de 307nm que aparece con la luz blanca (4A) y el pico de 297nm de **Aloesin** que aparece con la luz UV de baja longitud de onda. También se observa que el pico de alrededor de 221nm de **Aloe Emodin** aparece con la luz blanca.

Se puso en evidencia un efecto de fotoprotección de los extractos de *Aloe arborescens* y *Aloe maculata* obtenidos en oscuridad sobre la cepa GY5027 de *Escherichiacoli*

Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de los extractos acuosos y etanólicos de la pulpa madura y verde de los frutos de *Couroupita guianensis* Aubl. Soto, D y López, F. (2012), tutor Prof. Efrén Andrades. Este trabajo evaluó el efecto de la luz sobre los extractos acuosos y etanólicos de la pulpa del fruto maduro y verde de *Couroupita guianensis* Aubl. La metodología empleada incluye la recolección in situ, traslado, procesamiento en la oscuridad, extracciones acuosas y etanólicas, evitando siempre la incidencia de la luz. Se mostró la existencia de una fotosensibilidad del extracto de la pulpa de *Couroupita guianensis* Aubl., la cual fue demostrada espectrofotométricamente y es dependiente de la iluminación previa, del estado de madurez y del uso de etanol como solvente de extracción, además se demostró un efecto de fotoprotección U.V. en un ensayo usando bacterias sensibles a la luz.

Moléculas potencialmente fotosensibles, fotoactivables en el zumo de la pulpa madura, verde y hojas del noni, *Morinda citrifolia*. Méndez, J. Rosales, D. (2013), tutor Prof. Efrén Andrades. Este trabajo está orientado a la identificación de los compuestos derivados del fruto verde, maduro y hojas de *Morinda citrifolia* (noni), determinando si posee

propiedades fotosensibles y fotoactivables que puedan ser aplicables a terapias fotodinámicas, relacionadas a la cura del cáncer de piel u otras enfermedades cutáneas, y a la fabricación de cosméticos medicinales.

Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de extractos etanólicos de la hoja y epitelio de *Annona muricata*. Aldana, R. Páez, D. (2014), tutor Prof. Efrén Andrades. En este trabajo fueron preparados extractos etanólicos a partir de hojas frescas, epitelio y frutos verdes de la planta *Annona muricata*. Los extractos fueron examinados por espectrofotometría, cromatografía de capa fina, microbiología, y se le determinó fotoprotección / fotoactivación.

Los extractos de epitelio arrojaron toxicidad mientras que la hoja no. Además se observó el crecimiento de microorganismos en la hoja, posteriormente se verifica que los extractos efectuados con la hoja se protegen de la luz.

En la cromatografía se distinguió el RF 0,97 en la muestra indicando la clorofila presente tanto en hojas como en epitelio. En la espectrofotometría se halló la presencia de ácidos nucleicos y proteínas en longitud de onda 260 y 280 respectivamente. Se determinaron dos bandas de fotosensibilidad: una en el extracto de los epitelios del fruto a 210nm y otra en el extracto de las hojas a 675nm.

Extracto etanólico de flor y hoja de *Moringa* (*Moringa oleífera*). Rey, K. (2014), tutor Prof. Efrén Andrades. El extracto etanólico de la hoja presenta una absorción diferencial mayor en descendente que en ascendente, a una longitud de onda de 225 encontrándose allí un pico y en 231 un valle, con un RF de 0,7.

El extracto etanólico de la flor presenta una absorción diferencial mayor en ascendente que en descendente, a una longitud de onda de 225 encontrándose allí un valle y en 231 un pico con un RF de 0,75.

Estudio de los extractos etanólicos de la semilla y vaina de Moringa (*Moringa oleífera*). Vielma, Y. (2014), tutor Prof. Efrén Andrades. El extracto etanólico de la vaina presenta una absorción diferencial mayor en descendente que en ascendente, a una longitud de onda de 225nm, ese pico se debe corresponder a la banda nº 2 RF 0,74 ya que es en esa posición donde se presenta una banda oscura en la foto del cromatograma iluminado con luz UV de onda corta.

El extracto etanólico de la vaina presenta una absorción diferencial mayor en descendente que en ascendente, a una longitud de onda de 225nm.

www.bdigital.ula.ve

Bases teóricas

Fotosensibilizadores

Los sensibilizadores fotodinámicos son sustancias que al **absorber luz** inician reacciones fotoquímicas sobre otras moléculas sustrato. De acuerdo al tipo y nivel de acumulación de las modificaciones producidas, estas pueden ocasionar daño celular. (Pujol, Bochicchio y Rabossi, 2011)

Fotoprotección

En algunas culturas la piel bronceada es sinónimo de salud, buena forma y juventud, el uso de la radiación solar no sólo ofrece beneficios estéticos, también terapéuticos en diversas enfermedades y coadyuvante en la formación de vitamina D. Sin embargo la exposición más o menos prolongada puede producir a corto o largo plazo lesiones en la piel. En

razón a ello la industria médica y cosmética consideran prioritario la prevención, educando a la población en general sobre los efectos nocivos de las radiaciones solares e indicando las medidas adecuadas de fotoprotección. (Vitale, 2002)

Dentro de las estrategias de fotoprotección se encuentran la reducción de los tiempos de exposición, sobretodo en horas del mediodía, llevar ropas adecuadas, utilizar gorros, gafas y aplicar fotoprotectores. Según Gilaberte, et al., 2003, estos últimos pueden definirse como *“sustancias químicas que tienen la finalidad de proteger la estructura y preservar la función de la piel humana frente a los daños ocasionados por los rayos UV-B y UV-A”*. Es por ello que hoy día, son fundamentales aquellos que ofrecen protección de amplio espectro.

www.bdigitalula.ve

Fotoprotectores

Según la investigación realizada por Apaza Ticona, L. N. (2009). Elaboración y evaluación de una forma galénica de origen vegetal con actividad fotoprotectora. Ellos señalan que:

Los fotoprotectores tópicos o productos antisolares son preparados farmacéuticos de aplicación tópica que tienen la propiedad de **reflejar, absorber o refractar la radiación ultravioleta de origen solar**, atenuando la acción perjudicial de los rayos solares.

Principios De Fotoprotección

Las sustancias que se ponen sobre la piel con el fin de prevenir el daño solar, presentan los siguientes principios generales:

Absorción y Disminución de la Transmisión de UV; Se realiza en el estrato córneo, mediante el uso de sustancias químicas absorbentes de UV – B y UV – A.

Aumento de Dispersión UV; Se produce en el estrato córneo y epidermis viva, mediante el uso tópico de partículas micronizadas de dióxido de titanio, óxido de zinc o melanina.

Aumento de Reflexión de UV y Visible; Se realiza en el estrato córneo, por el uso de partículas micronizadas de dióxido de titanio y óxido Zinc.

Inactivación de las Especies Reactivas de Oxígeno; Se producen en las células viables de la epidermis y la dermis. Son inhibidos por antioxidantes de efectividad variable.

Clasificación www.bdigital.ula.ve

No existe una clasificación que contemple los diferentes aspectos de las sustancias fotoprotectoras. Se puede clasificar en:

De Acuerdo A Su Mecanismo De Acción

♣ **Protectores Químicos, Compuestos aromáticos conjugados con un grupo carbonilo.** Absorben los rayos UV de alta energía (Longitud de onda corta) con excitación a un estado de energía superior. Al retornar al estado basal, la energía liberada es de menor magnitud (Longitud de onda más larga).

♣ **Pantallas o Filtros Físicos,** Llamados también micronizados actúan mediante reflexión, dispersión y absorción, bloqueando la acción deletérea de la radiación UV.

De Acuerdo A Sus Características

♣ Protectores Químicos

Filtros Uv – B

- **PABA Y Derivados**, El ácido para amino benzoico es hidrosoluble y potente absorbente UV – B, se lo utiliza en vehículos alcohólicos. Los inconvenientes que presenta son; mancha la ropa y se lo asocia a abundantes reacciones adversas. Los éster derivados del PABA en especial el octildimetil PABA o Padimato O, son compatibles con diversas sustancias y vehículos, y registran menor incidencia de reacciones adversas.

- **Cinamatos**, Los segundos absorbentes UV – B, más potentes. El octilcinamato es el usado con mayor frecuencia.

- **Salicilatos**, Absorbentes UV – B, más débiles. Se utilizan para incrementar la potencia de otros absorbentes UV – B. Se usan con frecuencia el octisalicilato, seguido por el homosalicilato. Presentan gran perfil de seguridad y pueden solubilizar otros ingredientes.

- **Octocrileno**, Relacionado químicamente con los cinamatos. Se utiliza para reforzar el FPS y mejorar la resistencia al agua en una determinada formulación. Es muy fotoestable pudiendo mejorar esta propiedad en otros productos.

- **Ensilizol, Absorbente UV – B hidrosoluble**, utilizable en la fase acuosa de los sistemas de emulsión permitiendo una formulación menos grasa, y más estética. También se puede usar en geles transparentes.

Filtros Uv – A

- **Benzofenonas**, La oxibenzona se usa con mayor frecuencia. Absorbe con mayor eficacia los UV – B pero su espectro se extiende a los UV – A – II. Se utiliza como absorbente UV – A.

- **Antranilatos**, Son absorbentes UV – B, débiles y principalmente absorbentes UV – A – II, pero menos eficaces que las benzofenonas.

- **Avobenzona**, Nombre comercial Parsol 1789. Aprobada por la FDA para su uso como protector solar OTC. Absorbe intensamente el espectro UV – A – I. Los cuadros alérgicos son infrecuentes.

- **Dialcanfor de Tetraftalidina Ácido Sulfónico**, Su nombre comercial es Mexoryl SX. Absorbente UV – A amplio, de eficacia similar a la avobenzona.

♣ Protectores Físicos O Pantallas

Incluyen compuestos químicos inorgánicos como el óxido de zinc y el dióxido de titanio, elegidos por su alto índice de Refracción. La tecnología ha permitido su elaboración con un tamaño submicroscópico o micronizado (20 – 150 nm) imperceptible al ser aplicado sobre la piel. Como son partículas su tamaño impide que atraviesen la epidermis. El tamaño y la uniformidad de las partículas son la clave de su eficacia fotoprotectora, siendo fotoestables y seguros. Actúan mediante atenuación de la radiación UV, resultado de la combinación de los mecanismos reflexión, dispersión y absorción.

Oxido de Zinc, Es un óxido metálico con historia de uso tópico como protector de la piel. Aprobado por la FDA con categoría I, es seguro para la aplicación en piel inflamada y con afectación de la barrera cutánea, por lo que se le utiliza el manejo del eritema del pañal. De todos

los ingredientes disponibles sólo el óxido de zinc, protege de UV – B, UV – A – II y parcialmente de UV – A – I.

Dióxido de Titanio, Es un óxido metálico, químicamente casi inerte. Se ha demostrado una ligera fotosensibilidad de los cristales de superficie lo que da lugar a la formación de radicales libres. Esto se puede eliminar mediante técnicas de recubrimiento de los cristales con sílice o dimeticona. Debido a su mayor índice refractivo tiende a ser blanco y de difícil incorporación en productos invisibles. Presenta una protección frente a UV – B y UV – A – II.

De Acuerdo Su Espectro Uv De Protección

♣ UV – B

♣ UV – A

♣ AMPLIO (UV – B y UV – A)

De Acuerdo A Su Utilización

♣ PRIMARIOS (uso en la playa)

♣ SECUNDARIOS (uso en cosméticos y a diario)

De Acuerdo A Su Acción Fundamental

♣ Bronceadores, Producen pigmentación con un mínimo de quemadura. Filtran los rayos UV – B que tienen acción eritematogénica y permiten el paso de los rayos UV – A que tienen acción bronceadora.

Tabla 1. Fotoprotectores y su espectro de absorción UV-A y UV-B (nm). Tomado de Apaza Ticona, L. N. (2009).

FOTOPROTECTOR	ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV – A Y UV – B (nm)
PABA	260 – 313
Avobenzona(parsol 1789)	320 – 400
Cinamato	280 – 310
Dioxibenzona (benzofenona – 8)	260 – 355
Homosalicilato	290 – 320
Metilantranilato	280 – 340
Octocrilato	290 – 360
Octilmetoxicinamato	280 – 320
Octilsalicilato	280 – 320
Oxibenzona (benzofenona – 3)	320 – 360
Padimato O	264 – 320
Ácido sulfónico (fenilbenzimidazol)	290 – 320
Sulibenzona (benzofenona – 4)	260 – 360
Salicilato de trolamina	260 – 355
Óxido de cinc	300 – 400

Radiación Ultravioleta

Según los estudios realizados por Apaza Ticona, L. N. (2009), describen lo siguiente:

En la actualidad existe un cúmulo de evidencias y resultados, que vinculan la excesiva producción de especies reactivas del oxígeno, por la exposición a la radiación UV, como agente causal principal en la creciente

incidencia (aproximadamente 6 % anual) de afecciones malignas de la piel.

Estos antecedentes constituyen una base que justifica el desarrollo de investigaciones, en relación a las alteraciones que provoca la exposición prolongada de los seres vivos a la radiación UV, en la búsqueda de vías para prevenir, atenuar o eliminar las afecciones, que se puedan producir por esa causa.

La exposición de células a la radiación UV induce la expresión de numerosos genes, razón por la cual se consideran como el principal iniciador y promotor de procesos malignos en la piel.

Del espectro de la radiación UV, emitidas por el sol, que alcanzan la superficie terrestre, la radiación UV – B (comprendida entre los 280 a 320 nm.) es considerada como la más dañina, Ya que la radiación UV – A (de 315 a 400 nm.) es de menor energía aunque dañina en sobre exposición y la radiación UV – C (200 – 290 nm) es de mucha mayor energía, que es controlada por la capa de ozono estratosférico.

Tipos De Radiación Solar. (Según los estudios realizados por Apaza Ticona, L. N. 2009)

RAYOS UV – C: (200 – 290 nm). También conocidos como rayos germicidas, responsables de la eliminación de los microorganismos patógenos, bacterias, virus de aguas y virus de suelos, etc.).

RAYOS UV – B: (290 – 320 nm). 0,1% del total de energía electromagnética que alcanza la tierra. Producen intenso foto deterioro fisiopatológico, no penetran profundamente las capas de la piel, son

mayormente absorbidos justo encima de la dermis, siendo los causantes de la pigmentación dilatada de la piel (20 – 35 mL / cm).

RAYOS UV – A: (320 – 400 nm). 4,9% del total de energía electromagnética que alcanza la tierra. Presentan efectos foto biológicos acumulativos (efecto largo – proceso). Penetran profundamente dentro de la dermis y mas allá (50 – 60 mL / cm).

LUZ VISIBLE: (400 – 700 nm). 40% del total de energía electromagnética que alcanza la tierra. Se ha demostrado que presentan efectos de fotoenvejecimiento de poca importancia.

INFRARROJO: (700 – 3000 nm). El calor prolongado por estos rayos, ocasiona efectos adversos serios para la piel humana.

Efecto De La Radiación Ultravioleta – B En Los Seres Humanos. Apaza Ticona, L. N. (2009).

Una exposición prolongada a la luz solar, representa el principal factor ambiental dañino para la piel del hombre. Entre las alteraciones que induce la exposición a la radiación UV – B se puede mencionar la dermatoheliosis, causada por la generación de EROs (Especies Reactivas del Oxígeno), que pueden ocasionar daños sobre el DNA y las membranas celulares, provocando carcinogénesis y cambios asociados al fotoenvejecimiento.

Fuertes evidencias epidemiológicas relacionan la exposición a la radiación UV – B solar con la aparición de melanomas cutáneos, existiendo una estrecha correlación entre determinados fenotipos y la aparición de melanomas por exposición a esta radiación UV – B solar. Las exposiciones intermitentes y continuadas, y sobre todo, las exposiciones

en períodos tempranos de la vida (particularmente en la infancia), se relacionan con mayor riesgo en la aparición de melanomas.

Factores Que Rigen La Intensidad De Radiación Ultravioleta – B. Apaza Ticona, L. N. (2009).

Los principales factores influyen en la intensidad y composición de la radiación UV – B, son:

Elevación Solar

Para elevaciones solares altas la radiación UV – B, es mas intensa debido a que los rayos solares atraviesan un camino menor a través de la atmósfera, pasando por lo tanto por una menor cantidad de absorbentes.

Latitud

La latitud tiene una influencia directa en la intensidad y composición de la radiación UV – B. Por ejemplo, un incremento de altitud de 1.000 m, causa un aumento de 15% de UV – B, y el resto de UV – A, es constante. Mientras que a nivel del mar Muerto (400 m. b. n. m.), el UV – B, esta ausente.

Estación

A latitudes de 50° para arriba, poca o ninguna radiación UV – B, es detectable durante los meses de invierno. La radiación UV – A, por otro lado menos afectada por el ángulo del sol, esta presente alrededor de todo el año y puede producir eritemas en gente de piel con tez blanca. Por ejemplo en Copenhagüe (55° latitud norte), en invierno, las intensidades de UV – A directa y UV – B son 10% y 1% respectivamente de los valores de verano.

Hora Del Día

La irradiación espectral solar para longitudes de onda por debajo de 330 nm., decrece más rápidamente que lo que el ángulo de apogeo

solar se incrementa por longitudes de onda por encima de 330 nm. Entonces, las longitudes de onda UV – B, solares que alcanzan la tierra son mas fuertes dependiendo del ángulo de apogeo solar que los UV – A, o longitudes de onda en visibles.

Por lo tanto se interpreta que a medida que el sol llega al zenith (mediodía), los rayos UV – A, decrecen entre las 11:00 a. m. y 14:00 p. m., y los rayos UV – B, se encuentran en su valor mas alto.

Nubes

La radiación UV – B es mayor, generalmente para cielos totalmente despejados. Las nubes normalmente reducen la cantidad de radiación UV – B, pero la atenuación depende del espesor y tipo de estas. En ciertas condiciones, y por periodos cortos de tiempo, una pequeña cantidad de nubes finas o dispersas pueden hacer aumentar la cantidad de radiación UV – B, esto sucede normalmente en condiciones de cielos parcialmente cubiertos y con el sol visible.

Terapia Fotodinámica

Consiste en una técnica no invasiva, que fue introducida recientemente para tratar lesiones precancerosas de piel o los carcinomas espinocelulares in situ o enfermedad de Bowen. Está indicada para lesiones múltiples en áreas extensas y debido a que sus resultados son superiores a los de las terapias convencionales, ha tenido gran auge en el área cosmética, posibilitándola como una opción para casos localizados en áreas estéticas. (Garcés, 2013)

Su función se puede considerar combinada (físico – químico). Para ello se utiliza una fuente de luz, que al actuar sobre sustancias fotosensibilizantes origina una reacción química resultante en la producción de especies reactivas del oxígeno (citotóxicas), provocando la destrucción de las células cancerosas, se trata entonces de una

destrucción altamente selectiva. (Flores, 2014)

La administración de las sustancias fotosensibles puede ser a través de una crema previa preparación de la zona a tratar para favorecer la absorción o por vía intravenosa la cual se deposita de forma selectiva en el área enferma. Las células circundantes a la lesión no se destruyen aunque se iluminen durante el mismo tiempo y con la misma intensidad. (Garcés, 2011)

Cromatografía

Según Alfonso 2003, Comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares, que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial, mientras que la otra es un líquido el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. Los componentes de la mezcla deben tener dimensiones moleculares, lo que requiere que estén en soluciones o en el estado de vapor, la afinidad relativa de los solutos por cada fase debe ser reversible para asegurarse que ocurra transferencia de masa durante la separación cromatográfica. La fase fija se denomina fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada, sobre un material de soporte inerte. Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil o estacionaria.

Si la fase estacionaria es un sólido se denomina: cromatografía de adsorción, mientras que si es un líquido se denomina cromatografía de partición. Si la fase móvil es un líquido el proceso se denomina

cromatografía líquido-sólido, cuando la fase móvil es un gas el proceso se denomina cromatografía gas-sólido. Si la fase fija es un líquido y la fase móvil también, se denomina cromatografía líquido- líquido, si es un gas: cromatografía gas-líquido.

Existen otros tres modos de cromatografía en los cuales la fase estacionaria es un sólido y se clasifica de manera diferente a las demás debido a la naturaleza exclusiva de su proceso de separación. Estas son: cromatografía de intercambio iónico, por exclusión por tamaño y de afinidad.

Espectrofotometría

Según perso.wanadoo.es La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante, aun el vidrio que parece ser completamente transparente absorbe longitud de ondas que pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del infrarrojo.

La absorción de las radiaciones ultravioleta, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química.

Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida.

El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbida.

Los extractos

Son preparados farmacéuticos que por condiciones de higiene y preparación en su fabricación y envasado se realizan en laboratorios especializados, pero a nivel informativo equivale a preparar un jugo, en el que se adiciona agua destilada u otro medio y las plantas medicinales, por lo general se consideran tres tipos de extractos (Olaya, 2003).

Según Thomson, citado por Olaya 2006, se consideran tres tipos de extractos:

Los extractos fluidos que son aquellos en los que el volumen del líquido de extractos es igual al volumen de la planta seca que se haya usado.

Los extractos blandos son a los que se les ha retirado el agua parcialmente hasta tener una consistencia de ungüento.

Los extractos secos que son a los que se le ha retirado en su totalidad el agua y su apariencia es la de un polvo muy fino. Este tipo de extracto cuyo proceso consiste en secar la planta, pulverizarla y encapsularla es un método ideal para administrar las plantas de sabor amargo.

En Fitoterapia se mezclan distintos tipos de extractos para obtener la terapia medicinal deseada y se suelen presentar en forma de elixires, esencias y alcoholaturas.

Según Ortuño, 2006, los extractos son fundamentalmente para aquellas plantas medicinales que no contienen aceites esenciales, pero si otros compuestos activos con variadas propiedades. También para plantas cuya pequeña concentración de aceite esencial ofrece un rendimiento muy bajo en la destilación, o bien se destruye con el calor.

En general, los extractos son productos mas diluidos que los aceites esenciales, aunque pueden ser bastante concentrados y por eso son recomendables para la fabricación de jarabes, jabones con propiedades cosméticas, lociones y alimentos (Ortuño, 2006).

Métodos de extracción

Las tinturas y su preparación

Según Olaya, 2003, Son la extracción de los principios activos de las plantas por medio de alcohol etílico, éter, una mezcla de ambas, o licores como vino, vodka, aguardiente, pisco o ginebra de buena calidad. La preparación se hace de manera muy sencilla: por remojo o por maceración.

Por remojo: es la técnica similar a la de los licores aromáticos de las abuelas, en la que las partes enteras empleadas de las plantas, frescas o secas se dejan en remojo durante varias semanas. Puede utilizar una proporción de 125 gramos de hierba seca o 300 gramos de hierba fresca por 600 mililitros de vodka, o medio litro de una mezcla al 25% de alcohol y agua. Luego se retiran las plantas, se cuelan y se almacena la tintura obtenida en frascos, preferiblemente de color ámbar en un lugar oscuro y fresco.

Preparación por maceración: una vez escogidas las plantas la maceración se hace con mortero o con piedra y luego se mezcla con el alcohol o el licor dejando en reposo un tiempo para que se decante. Después se filtra y se envasa igual que en el caso anterior. Una tintura en buenas condiciones de almacenamiento puede durar hasta 2 años sin perder sus propiedades.

Precaución con las tinturas

Se debe observar especial cuidado en el manejo de las tinturas con las personas diabéticas, alcohólicas, los niños, y mujeres embarazadas. Es conveniente la dilución de alcoholes absolutos o de alta graduación en agua muy pura. Las afecciones hepáticas no deben ser tratadas con este tipo de aplicación (Olaya, 2003).

La infusión, tisana o agua aromática

Es la forma más sencilla y común de emplear las hierbas medicinales, es muy utilizada para curar malestares como gripas, indigestiones o ataques de nervios, usualmente se emplean como sobremesa de una comida abundante o en las horas de la tarde reemplazando el té. Puede beberse caliente o fría (Olaya, 2003).

Según Olaya, 2003, las infusiones se preparan fácilmente:

Tomar unos gramos de la planta fresca o seca, se pueden emplear diferentes partes: flores, tallos, hojas. Se coloca la planta en un recipiente y se adiciona agua casi en el punto de ebullición (no se usa agua hirviendo porque el vapor se lleva gran parte de los aceites volátiles y se pierden propiedades valiosas de la planta).

Se deja reposar de cinco a diez minutos tapada con un plato pequeño o en una tetera, se cuela y se consume. Generalmente son preparadas a diario para que no pierdan sus principios activos, es decir, pueden durar 24 horas y consumir fría o calientes.

La decocción

Esta es una forma más fuerte de obtener los constituyentes activos de una planta, se realiza colocando unos gramos de la planta en agua fría y se coloca a hervir durante el tiempo necesario para que se reduzca en un tercio. Después se cuela y se puede consumir fría o caliente. Las decocciones son muy utilizadas con raíces, semillas, ramas y tallos, aunque también con hojas y flores, tiene una vida útil de 24 horas y se deben preparar a diario (Olaya, 2003).

Según Ortuño, 2006, la decocción es igual que la infusión pero manteniendo la calefacción una vez que se añade al agua el material vegetal. Se utiliza en plantas con componentes no sensibles al calor y cuya estructura, muy fibrosa o con corteza dura, dificulta la penetración del agua y la disolución de las sustancias. Bayas, cortezas, frutos duros suelen tratarse de esta forma sino pueden triturarse adecuadamente.

BIDENS PILOSA L.

Bidens pilosa es una especie de planta perteneciente a la familia Asteraceae. Es considerada una mala hierba en algunos hábitats tropicales. Sin embargo, en algunas partes del mundo es una fuente de alimento. Es originaria de Sudamérica y tiene una distribución cosmopolita.

Según los estudios realizados por Lastra y Ponce para el año 2001 *Bidens pilosa L.* es una hierba que muestra tanto en hojas, como en tallos y raíces un amplio espectro de acciones farmacológicas, dentro de las que sobresalen antiulcerosa, antimicrobiana, hipoglicemiante, todo lo cual demuestra la potencialidad de esta planta en Fitoterapia médica.

Los estudios químicos realizados tanto a la droga como a extractos permiten conocer los metabolitos que conforman la composición de la planta entre los que se encuentran: taninos, esteroides y esteroides, flavonoides, glucósidos aurona y chalconas, polisacáridos entre otros. Todo lo anterior está en plena concordancia con la gran variedad de propiedades farmacológicas presentadas por dicha planta.

No obstante al igual que en los estudios farmacológicos, los químicos han sido realizados en años relativamente recientes, por lo cual aún se puede esperar el aislamiento de otros tipos de estructuras



Figura 1. *Bidens pilosa* L. planta entera



Figura 2. Flor de la planta *Bidens pilosa* L.



Figura 3. Flores, hojas y tallos de la planta *Bidens pilosa* L.

Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

(sin clasif.): *Eudicots*

(sin clasif.): Asterids

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Coreopsideae

Género: Bidens

Especie: ***Bidens pilosa* L.**

www.bdigital.ula.ve

Descripción de la planta

La flor que se aprecia a primera vista es en realidad un tipo de inflorescencia conocida como capítulo, las flores del disco son fértiles y de color amarillo (parte central de la inflorescencia), las flores de la periferia son estériles y de color blanco. Las semillas son de color negro y se adhieren a la ganadería y los seres humanos.

Sinónimo: *Bidens leucantha* var. *Pilosa* (L.) Griseb

Nombres comunes: Masiquia, cadillo (Antioquia), cadillo rosero (Venezuela) para (*B. pilosa* L. var. *radiata* Sch. = *B. leucantha* Willd, = *Coreopsis leucantha* L.).

Botánica

Descripción: hierba anual, erecta, ramificada, ramas cuadrangulares, espaciadamente pilosas hasta glabras. Hojas, pecioladas, aserradas, peciolo 1,0 a 6,5 cm de largo; cabezuelas en la antesis 7 a 10 mm de diámetro, solitaria sobre pedúnculos de 5 a 10 cm de largos, las superiores constituidas por 1 a 3 pares de pinas con los foliolos ovados o lanceolado ovados, truncados hasta cuneados en la base, acuminados en el ápice; glabras por ambas caras o escasamente puberulentas; hojas inferiores por lo general no divididas. Involucro biseriado, acampanado; brácteas externas lineales, foliáceas, cilioladas, glabras, mucronuladas en el ápice; brácteas internas lanceolado oblongas, de unos 5 mm de largo, glabras. Cabezuelas heterógamas radiadas, en algunos cabezuelas homogamas y discoideas por ausencia de las flores del radio; flores del radio neutras, corolas liguladas, tubos espaciadamente piloso hasta glabrescentes, 1,0 a 1,5 mm de largo, lamina oblonga, 5 a 12 mm de largo, glabra; flores del disco hermafroditas; corola tubulosa, glabras, de unos cuatro mm de largo, aquenios lineales, tetrágonos o subcomprimidos, glabros hacia abajo y tuberculados estrigosos hacia arriba, 4 a 16 mm de largo; en casos excepcionales aristas de papús en números de 3 a 5 (Trujillo y Madrigal, 2005).

Descripción micro morfológica: según Lastra y Ponce, 2001, en la descripción micro morfológica se encuentran:

Hoja: el mesófilo encontrado es de tipo heterogéneo asimétrico, constituido por una epidermis formada por una única capa de célula, presentando muchos pelos pluricelulares, seguido un parénquima palisádico, también con una única capa celular y un parénquima lacunoso, debajo del cual se encuentra una epidermis inferior.

La nervadura principal se presenta como una epidermis superior, seguida por un parénquima, en el cual son observadas células colenquimatosas, agrupadas de manera regular. En el interior del parénquima se visualizan un canal excretor. Debajo del parénquima se encuentra una epidermis inferior.

Tallo: presenta epidermis recubierta por cutícula con pelo pluricelulares, debajo de esta se evidencia un colénquima, seguido de parénquima cortical, entre los cuales pueden ser visualizados un canal excretor. Le sigue una endodermis con estrías de Caspary.

Luego, se puede encontrar una formación constituida por fibras floemáticas, cambio del xilema, rodeada por radios medulares. Se evidencia un protoxilema, a partir del cual se establece un parénquima medular.

www.bdigital.ula.ve

Raíz: fue encontrada epidermis con más de una capa celular y se visualiza un parénquima cortical constituido por células aproximadamente cuadrangulares, con espacios intercelulares con forma de losange. Luego se encuentra la endodermis presentando estrías de Caspary, dentro de las cuales se aprecia un xilema dispuesto en radios medulares, entre los cuales se encuentran traquídeos irregularmente dispuestos.

Etnobotánica

Usos: paludismo, hígado, bazo

Formas de uso: hígado, bazo: en zumo, cocida o comida. Cocida: un puñado de ramas en un litro y medio de agua y se cocina cinco minutos; se toma por taza como agua de tiempo, hasta obtener la curación. Crudo: comida en ensalada. En zumos: tres cogollos para una

toma en medio vaso de agua o un pocillo, toma tres a cinco veces, hasta que sienta mejoría. El zumo se machaca en una piedra y luego se remoja en el agua que se tiene, se cierne y se toma. Paludismo: hoja de limón, llantén, tomate, Masiquia, verbena, nacedero, una punta de cada una para medio galón de agua; cocinar quince minutos, toma un pocillo cada dos o tres horas hasta obtener la curación total (Trujillo y Madrigal, 2005).

Otros usos en medicina tradicional: en la zona de estudio también se usa para vesícula biliar, páncreas, despercudir la piel de machas, barros pecas y espinillas. Los indígenas cuna usan la raíz para el dolor de cabeza. Es medicinal estimulante, antiescorbútica, antileucorreica, desobstrúyete del hígado, rebotes biliosos, indigestión, diarrea, las raíces son odontológicas; es sialagoga, vermífuga, antidisenterica y vulneraria. La variedad radiata de esta especie es hipoglicemiante, cura la diabetes. En las Bahamas las hojas se usan en forma de emplastos para granos infectados y salpullido. En Hawái las hojas de *Bidens* se emplean para la debilidad general, la estimulación del apetito y para curar el asma (Trujillo y Madrigal, 2005).

Composición química y toxicidad

La planta contiene resinas naturales, tanino, ácido gálico, ácido oxálico, oligoelementos, así como ácido fosfórico, sulfúricos, carbónicos y clorhídricos, aminos y triterpenos, el análisis proximal de 100 gramos de la hoja seca contienen 295 calorías. 24, 5 gramos de proteínas; 4,0 gramos de grasa, 54,4 gramos de carbohidratos totales, 12,1 gramos de fibra, 15,1 gramos de ceniza, 1.721,0 mg de calcio, 273 mg de fósforo, 11mg de sodio, 267 mg de potasio; la semilla contiene 17,5 % de proteínas y 17,1% de grasas. En la hoja de esta planta existen depósitos de sílice. Se dice que la *Bidens pilosa* produce ceguera cuando se usa para la diabetes, y que es una complicación inherente a ella, por lo que se cree que es insuficiente la cura. La mayoría de los miembros de esta familia

contiene sesquiterpen lactonas, muchas de las cuales son citotóxicas (Trujillo y Madrigal, 2005).

Actividad biológica

Los cogollos de las flores en extractos acuosos y clorofórmicos no presentan actividad frente a *Plasmodium gallinaceum* por otro lado la raíz de *Bidens segetum* tampoco presenta actividad frente a *P. berghei*. La parte aérea resulta ser débilmente activa frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis* (Trujillo y Madrigal, 2005).

**Tabla 2. Componentes aislados de extractos de *Bidens pilosa*.
Tomado de (Trujillo y Madrigal, 2005)**

Componentes	Contenido (%)	Actividad biológica
Extracto con éter de petróleo		
Fenilhepratrina	0,003	Antimicrobiana, fungicida, antihelmíntica, antiprotozoaria, cercaricida
Acido linólico	0,005	Bacteriostático, fungicida.
Acido α -linolénico	0,006	Bacteriostático, fungicida
Escualeno	0,008	Bacteriostático, fungicida.
Friedelin	0,007	Antiinflamatorio, anticonvulsivante, fungistático.

Friedelan-3- β -ol	0,004	Antiinflamatorio, anticonvulsivante.
Estigmasterol, β -sitosterol, campesterol	0,003	Antibacteriano.
Mezcla de triglicéridos	0,4	
Mezcla de n-alcanos	0,03	Antibacteriana
Extracto metabólico		
Luteolin 7-O- β -D-glucopiranosido	0,005	Antiinflamatorio
Quercetin-3-O- β -D-glucopiranosido	0,01	Antiinflamatorio
Quercetin-3-O- β -D-galactopiranosido	0,006	Antiinflamatorio
Extracto metanol/agua quercetin 3-O- β -D	0,02	antiinflamatorio

Hipótesis

Ante la presencia de cualquier problema o incógnita, toda persona esta en capacidad de suponer, sospechar y de buscar probables explicaciones. Tales conjeturas se denominan hipótesis (Arias, 2006).

A continuación se presentan las hipótesis planteadas en el problema de investigación, las mismas nos orientaron en la investigación.

Los extractos etanólicos de la planta *Bidens pilosa* L. pueden presentar niveles de fotosensibilidad en luz UV y luz blanca.

Es posible que los extractos etanólicos de la planta *Bidens Pilosa* Linné presenten fotoprotección.

Es posible que los extractos y etanólicos de la planta *Bidens Pilosa* Linné presenten alguna actividad biológica.

Capítulo III

Marco metodológico

La metodología del proyecto incluye el tipo o tipos de investigación, las técnicas o procedimientos que serán utilizados para llevar a cabo la indagación (Arias, 1999).

Sobre el tipo de investigación, Canales (1996) señala:

“hay diferentes tipos de investigación, los cuales se clasifican según distintos criterios” (p. 53).

Enfoque de la investigación:

En la presente investigación se muestra un enfoque tipo mixto ya que abarca enfoque cualitativos y cuantitativos.

Según Sampieri, 2006 surge de la combinación del enfoque cualitativo y el enfoque cuantitativo:

El enfoque cuantitativo utiliza la recolección y el análisis de datos para contestar preguntas de investigación y probar hipótesis establecidas previamente, y confía en la medición numérica, el conteo y frecuentemente en el uso de la estadística para establecer con exactitud patrones de comportamiento en una población.

Mediante la medición del efecto que produce el extracto etanólicos de las flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L., se pudieron recolectar los datos, para de esta manera, corroborar las hipótesis planteadas.

El enfoque cualitativo utiliza recolección de datos sin medición numérica para descubrir o afinar preguntas de investigación y puede o no probar hipótesis en su proceso de interpretación.

Nivel de investigación

El nivel de investigación se refiere al grado de profundidad con que se aborda un objeto o fenómeno, aquí se indicara si es una investigación exploratoria, descriptiva o explicativa (Arias, 1999).

La presente investigación es de tipo explicativa, ya que según Arias, 1999, la investigación explicativa se encarga de buscar el por qué de los hechos, mediante el establecimiento de relación de causa y efecto.

Diseño de investigación

El diseño de la investigación es la estrategia que adopta el investigador para responder al problema planteado (Arias, 1999).

En la presente investigación el diseño es de tipo experimental y de campo. Ya que según Arias, 1999, la investigación experimental es un proceso que consiste en someter a un objeto a grupos de individuos a determinadas condiciones o estímulos (variable independiente), para observar los efectos que se producen (variable dependiente). De tal modo, se sometieron los extractos etanólicos de las flores y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. a diferentes estímulos para de esta manera evaluar el efecto que se producen.

La investigación de campo consiste en la recolección de datos directamente de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar variable alguna.

Población y muestra

La población o universo de estudio se refiere al conjunto para el cual serán válidas las conclusiones que se obtengan, a los elementos o unidades involucradas en la investigación. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Morales 1994 citado por Arias 1999).

En la presente investigación el muestreo fue No probabilístico. Según Arias, 1999 el muestro no probabilístico es un procedimiento de selección en el que se desconoce la probabilidad que tienen los elementos de la población para integrar la muestra.

El muestreo no probabilístico será por cuotas. Según Arias, (1999). El muestro no probabilístico por cuotas se basa en la escogencia de los elementos, en función de la población, de modo tal que se conformen grupos de cuotas correspondiente en cada característica

MATERIALES Y METODOS

Materiales

No biológicos

Mortero.

Alcohol etílico.

Frascos ámbar.

Tul.

Tirro.

Cinta pegante.

Lamina de aluminio.

Emboplat.

Papel óptico.
Bolsas negras.
Micropipetas.
Puntillas azules blancas y amarillas.
Cubetas de cuarzo.
Tubos eppendorf.
Tubos de ensayo.
Gradillas.
Frascos de desecho.
Placa de petri.

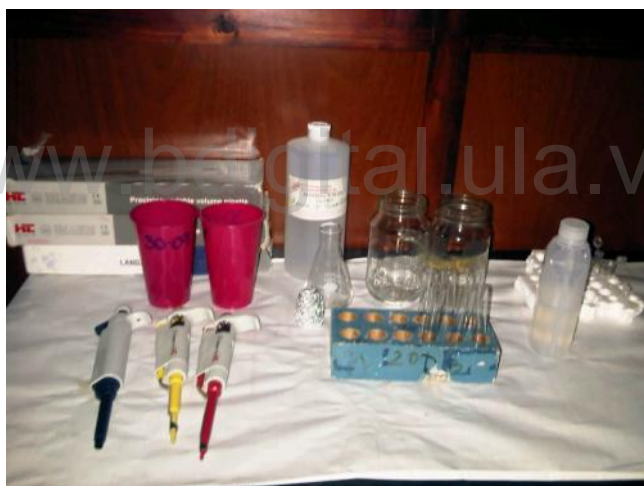


Figura 4. Materiales utilizados en la parte experimental.

Material biológico:

1. Los especímenes de la planta *Bidens pilosa* L. (hoja y flor) se tomaron de los alrededores de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, Mérida – Venezuela.

2. El microorganismo sobre los cuales se ensayaron los extractos de la referida planta los suministró de su colección de cepas el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes: *Escherichia coli* GY5027.

Métodos

Estrategias para la recolección de las muestras

Las muestras de las plantas fueron recolectadas en los alrededores de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, con ayuda del **programa Google Earth** se pudo obtener la ubicación exacta de de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, la cual posee:

Una latitud de 8°34'47.62"N.

Una longitud de 71° 9'20.90"O.

Una temperatura de 27 grados centígrados.

Una altura 1.600 m.s.n.m.

Luego fueron trasladadas en bolsas negras hasta los laboratorios de la seccional de Biotecnología del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis para la preparación de los extractos etanólicos.

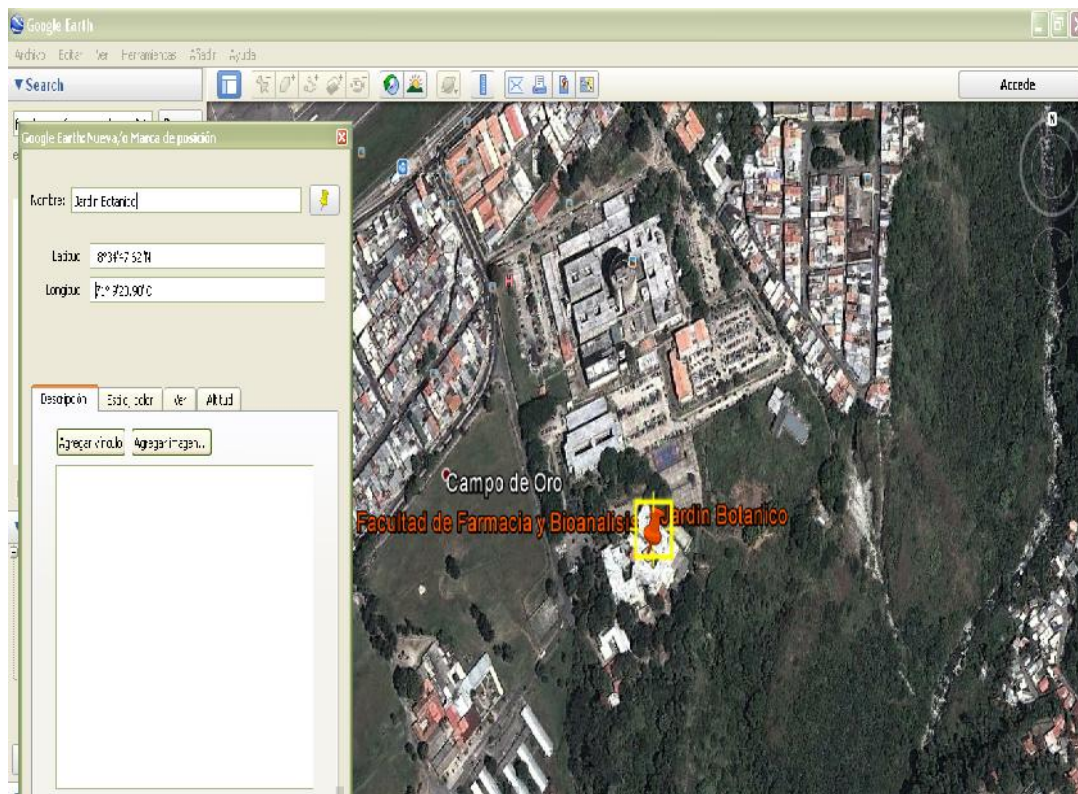


Figura 5. Ubicación satelital de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. (Programa Google Earth).

A las plantas recolectadas se les eliminó el exceso de tierra, luego fueron pesadas con raíz, sin raíz, peso de la raíz, peso de las flores, peso de las hojas, peso de las ramas.

Tabla 3. Peso de las partes de la planta 1 *Bidens pilosa* L.

Muestra	Peso (g)
Planta entera	7,14
Planta sin raíz	4,75
Raíz de la planta	1,90
Flores	0,46
Hojas	2,40
Ramas	2,53

Tabla 4. Peso de las partes de la planta 2 *Bidens pilosa* L.

Muestra	Peso (g)
Planta entera	8,12
Planta sin raíz	5,65
Raíz de la planta	2,20
Flores	0,70
Hojas	3,50
Ramas	3,60

Tabla 5. Peso de las partes de la planta 3 *Bidens pilosa* L.

Muestra	Peso (g)
Planta entera	12,04
Planta sin raíz	8,90
Raíz de la planta	3,10
Flores	1,00
Hojas	5,00
Ramas	4,90

Preparación de los extractos

Una vez pesadas las plantas enteras, flores y hojas se prepararon los extractos etanólicos en la oscuridad.

Metodología para la obtención de los extractos etanólicos

Extracción de las muestras en la oscuridad, se procedió de la siguiente manera

Se mezcló la flor con el etanol y se macera, al obtener el extracto se guarda en frío y oscuridad. Para realizar el extracto etanólico, se usó el método de extracción rápida usado en la sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB).

www.bdigital.ula.ve

Este método tiene la virtud de llegar a un extracto crudo rápidamente, usando solventes biopermisivos y bioamables, lo cual evita la Biotransformación, Bioconversión y Biodegradación del material. Además, permite que algunas macromoléculas sean extraídas junto con metabolitos, moléculas orgánicas e inorgánicas.

- En un mortero se colocaron las flores (1g) y se les agregó 2 mL de etanol se maceraron, posteriormente se decantó, recuperando 1 mL de extracto, este fue envasado en un frasco ámbar envuelto en lámina aluminio, con el rótulo CLF61014 ETANÓLICO.
- Para preparar el extracto de hojas , de igual forma fueron colocadas en un mortero 10 gr de hojas y se les agregó 10 mL de etanol, se maceraron, posteriormente se filtró con un tul

recuperándose 5 mL y fue envasado en un frasco ámbar envuelto en lámina de aluminio con el rotulo CLH61014 ETANÓLICO. Ambos fueron conservados en la nevera a 4 grados centígrados.

Calculo de P/V y concentraciones

El cálculo de concentraciones de los extractos, se realizó de manera **retrospectiva**, ya que se obtuvo el peso seco del extracto a partir de un volumen de extracto agregado. Y de forma **prospectiva** ya que el peso seco obtenido del extracto fue resuspendidos posteriormente en agua.

Concentración en g/mL: g material vegetal/ mL disolución

Flores:

Peso de la flor/Volumen total= 1g/2mL= 0,5 g/mL

Hojas

P/V= 10g/10mL= 1g/mL

Tabla 6. Cantidades utilizadas para la preparación de extractos etanólicos.

Muestra	Peso (g.)	Vol. De etanol (ml)	Relación P/V (g./mL)
Flores	1	2	0,5
Hojas	10	10	1

Las alícuotas se destinaron para ensayos de fotosensibilidad, cromatografía y actividad biológica.

Metodología para la obtención de los extractos etanólicos resuspendidos en agua.

Extracción de la muestra en la oscuridad

Una vez preparados los extractos etanólicos, se procedió a lo siguiente:

- Se agregó 1mL del extracto concentrado de hoja en el tubo eppendorf pre pesado y 100 microlitros de extracto concentrado de flor en el tubo pre pesado (el resto se refrigeró). Ambos tubos se cubrieron con aluminio para proteger los extractos de la luz, Los pesos obtenidos de los tubos vacíos pre pesados fueron los siguientes:
Tubo 1 (hoja P1): 0,9866 g.
Tubo 2 (flor P1): 0,9905 g.
- Posteriormente se colocaron en la estufa durante 48 horas de secado a una temperatura de 60 grados centígrados, al sacarlos se pesaron de nuevo obteniendo el peso 2 (P2), los pesos obtenidos fueron los siguientes:
Tubo 1 (hoja P2): 1,0004 g.
Tubo 2 (flor P2): 0,9926 g.
- Luego fueron resuspendidos cada uno, en 100 microlitos de agua estéril

- o **Cálculo de las concentraciones de los extractos de hoja y flor, de acuerdo al peso seco obtenido:**

Hoja:

$P2 (1,0004) - P1 (0,9866 \text{ g.}) = 0,0138 \text{ g.}$ (Peso seco del extracto).

Se transforma a miligramos.

Y nos da un resultado de **13,8 miligramos que estaban en 1 mililitro de extracto de hoja.**

Concentración final en el agua = Peso del extracto/Vol. De agua destilada agregado al extracto puro

Concentración= $13,8 \text{ mg} / 0,1 \text{ mL} = 138 \text{ miligramos/mililitro}$, de extracto etanólico de hoja resuspendido en agua.

Flor:

$P2 (0,9926 \text{ g.}) - P1 (0,9905 \text{ g.}) = 0,0021 \text{ g.}$ (peso del extracto).

Lo llevamos a miligramos.

Sería **2,1 mg en 0,1 ml de extracto de flor.**

Entonces la concentración efectiva del soluto seco de la flor del extracto es 21 mg/mL.

Concentración final en el agua=

$2,1\text{mg}/0,1 \text{ mL} = 21 \text{ mg /mL}$ de extracto etanólico de flor resuspendido en agua. **Si lo expresamos en ug/ul = 21.**

Tabla 7. Cálculo de concentración de extractos etanólico resuspendidos en agua.

Peso del tubo (g.) (P1)	Peso del tubo + extracto seco (g.) (P2)	Resta (P2 – P1) (g)	Concentraciones (mg/mL o ug/ul)
Tubo 1 hoja: 0,9866	1,0004	0,0138	138
Tubo 2 flor: 0,9905	0,9926	0,0021	21

Las alícuotas se destinaron para ensayos de actividad biológica y fotoprotección.

Para determinar el **peso total de extracto** que se origina de cada muestra biológica (total de hojas y flores), se procede de la siguiente manera:

Hoja:

Peso total de extracto= [Del extracto] x volumen total del extracto

Peso total de extracto= 13,8 miligramos/mL x 5 mililitros

Peso total de extracto= 69 miligramos en 10 g. de hoja.

Flor:

Peso total de extracto= 21 miligramos/mL x 1mL

Peso total del extracto= 21 miligramos en 1 g. de flor.

Una vez culminada la extracción etanólica de flores y hojas se pesaron los bagazos o residuos de las mismas. Arrojándonos los siguientes resultados:

Bagazo de hoja: 5gr

Bagazo de flor: 0,5gr



Figura 6. Bagazo de flores y hojas.

Espectrofotometría: Ensayo de fotosensibilidad.

Para determinar si existe alguna fotosensibilidad o fotoactivación en la sección de Biotecnología se ha diseñado un sistema usando la irradiación del monocromador del espectrofotómetro para sensibilizar/activar los extractos y al mismo tiempo detectar los cambios de absorción en las diferentes longitudes de onda. Para ello se hace un espectro ascendente en una dilución determinada y un espectro descendente en la misma dirección. Ambas muestras son alícuotas distintas de la misma dilución.

Para el extracto etanólicos de la flor se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente en la región ultravioleta, desde 190nm a

290nm y de 290 a 390nm luego un barrido descendente desde 390 nm a 290 nm y de 290nm a 190nm, con un intervalo de longitud de onda de 1 en 1, a velocidad de barrido lenta. La dilución utilizada fue de 1/300, disolviendo 20 ul (0,42 ug/ul) de extracto etanólico de flor en 6 mL de alcohol.

Para el extracto etanólicos de la hoja, de igual manera, se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente en la región ultravioleta, desde 190nm a 290nm y de 290 a 390nm luego un barrido descendente desde 390 nm a 290 nm y de 290nm a 190nm, con un intervalo de longitud de onda de 1 en 1, a velocidad de barrido lenta. La dilución utilizada fue de 1/300, disolviendo 20 ul de extracto etanólico de hoja en 6 mL de alcohol.

Adicionalmente el extracto de la hoja también se realizó un barrido espectrofotométrico ascendente analizado en la región visible desde 400nm a 500nm luego de 500nm a 600nm y por ultimo de 600nm a 700nm, con un intervalo de longitud de onda de 5 en 5, a una velocidad de barrido turbo. La dilución empleada fue de 1/30, 100 ul (1,38) del extracto de hojas en 2,9 mL de alcohol.

Se utilizó etanol como blanco para ajustar el equipo a cero y celdas de cuarzo para todas las mediciones en el espectrofotómetro GENESYS 10 BIO.

Cromatografía en capa fina

Se realizó una cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon placas Merck TLC silica gel 60 F₂₅₄ N° 1.05554_0001 20x20cm ajustada a 10 cm por cada lado, para activarla, la misma se colocó durante 60 minutos en una estufa á 37° C.

Posteriormente se dibujó la línea de siembra y la línea frente del disolvente a un centímetro del borde inferior y superior respectivamente y se calculó el sitio de siembra aproximado. Con ayuda de micropipetas se colocó para la corrida 5, 10 y 25 μL de cada extracto.

Tabla 8. Cantidades de extractos utilizados en la cromatografía.

Flor	Hoja
5ul (0,105 ug/ul) , 10ul (0,21 ug/ul) y 15ul (0,315ug/ul)	5(0,069ug/ul), 10(0,138ug/ul) y 15ul (0,207 ug/ul)

Se empleó como fase móvil un solvente compuesto por: 100mL de acetato de etilo, 17mL de metanol y 13mL de agua destilada. La corrida completa se realizó en 35 minutos en la oscuridad.

La corrida se realizó hasta que el solvente alcanzó la línea de frente.

Después de la corrida, la placa se colocó en una estufa á 37° C por una hora. Se observó en luz blanca, luz UV onda corta 254 nm y luz UV onda larga 365 nm, en los casos se fotografió la placa **Figuras 9, 10 y 11** y luego se guardó en una estufa á 37° C envuelta en papel marrón. La lámpara utilizada es marca Mineralight Modelo UVL-25, 115 Volts, 60 Hz, 0,15 Amps / Ultra-Violet Products INC. San Gabriel California, U.S.A.

Actividad biológica y Fotoprotección

Para realizar la determinación de actividad biológica de los extractos etanólicos y etanólicos resuspendidos en agua se realizaron 3 ensayos. En los tres casos se dividió una placa de petri que contenía Agar

Tripticasa de Soja, en tres tercios o sectores y éstos a su vez de dividieron en 5 espacios para colocar los extractos solos, los extractos con la bacteria GY5027 y la bacteria sola **Figura 7**.

Dichos espacios estaban identificados de la siguiente manera:

1. Bacteria (GY).
 2. Bacteria (GY) + extracto de flor (F).
 3. Bacteria (GY)+ extracto de hoja (H).
 4. Extracto de flor (F).
 5. Extracto de hoja (H).
- } **Para saber si produce o no bacterias, y con esto verificar su esterilidad.**



Figura 7. Placa de petri dividida para los ensayos.

El primer ensayo (Etanólico puro):

En condiciones de oscuridad se agregaron 3 ul de la cepa GY5027 (en Caldo Tripticasa de Soja) y 3 ul (0,063 ug/ul) del extracto etanólico de flor y 3 ul (0,0414 ug/ul) de extracto etanólico de hoja en los sitios correspondientes y se dejó secar por 20 minutos.

El segundo ensayo (Extracto etanólico evaporado):

En condiciones de oscuridad se agregaron 3 ul del extracto etanólico de flor y de hoja (con concentraciones respectivas de 0,063 ug/ul y 0,0414ug/ul) en los sitios correspondientes de una placa con Agar Tripticasa Soja, éste se dejó evaporar durante 5 minutos, posteriormente se sembraron 3 ul de la cepa GY5027 (en Caldo Tripticasa de Soja) en los sitios correspondientes y se dejó secar por 20 minutos.

Este ensayo es una innovación ya que por primera vez en el laboratorio de Biotecnología se ensaya colocando primero el extracto, para dejar que éste difunda, penetre en el agar y se evapore el etanol, y luego se coloca la muestra de bacterias vivas. Esta metodología tiene la virtud de ejercer menos manipulación sobre la muestra a la cual se quiere proteger de la luz.

El tercer ensayo (Extracto etanólicos resuspendido en agua):

Se tomó 1mL del extracto etanólico de hoja y 100 ul del extracto etanólico de flor fueron secado en una estufa á 60°C durante 48 horas y resuspendido posteriormente en 100 µL de agua destilada obteniéndose los siguientes valores de concentración: extracto de la flor 21 mg/ml, extracto de las hojas 138 mg/ml.

En condiciones de oscuridad se agregaron 3 ul de la cepa GY5027 (en Caldo Tripticasa de Soja) en los sitios correspondientes se dejó secar por 6 minutos, posteriormente se agregaron 3 ul del extracto etanólico de flor resuspendido en agua y 3 ul de extracto etanólico de hoja, (concentraciones respectivas 0,63ug/ul y 4,14ug/ul) en los sitios correspondientes.

Finalmente en el caso de las tres placas, uno de los tercios o sectores se irradió durante 30 segundos con lámpara UV a una distancia de 48 cm, otro se irradió con luz blanca a la misma distancia durante 5 minutos y el tercero se mantuvo en oscuridad. Todo esto se realizó con la ayuda de una plantilla que protegía los sectores que no estaban siendo irradiados. La placa se envolvió en lámina aluminio y se incubó por 24 horas á 37° C.



Figura 8. Plantilla para protección de sectores irradiados con luz UV y luz blanca.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

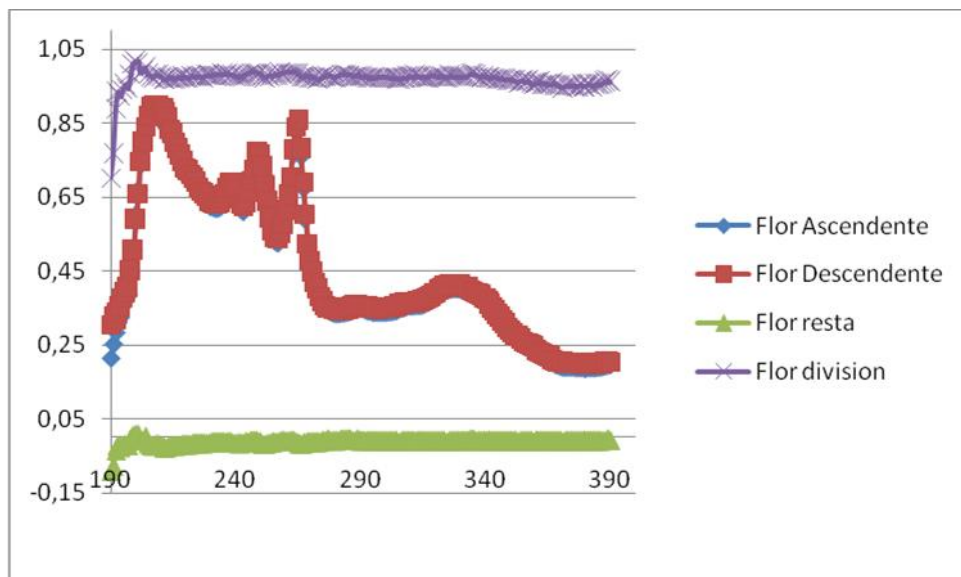
Resultados de la fotosensibilidad evaluados por espectrofotometría.

Se realizó un espectro ascendente (A) (190-390nm) y descendente (D) (390-190nm) para el extracto etanólico de la flor (muestra 1), de *Bidens pilosa* L. sin exposición a la luz blanca. En este experimento se incluyen los espectros originales y los espectros diferenciales (resta y división) para obtener los valores y las tendencias comparativas.

Para el extracto de la hoja de igual manera se realizó espectro ascendente (A) (190-390nm) y descendente (D) (390-190nm), además, fue trabajado en luz visible entre 400-700nm ascendente.

En los experimentos se trató de poner en evidencia la fotosensibilidad de las muestras ascendente y descendente, y la relación diferencial comparativa de ambos espectros. Los espectros se midieron en cubetas de cuarzo, el ascendente desde ultravioleta hasta el rojo lejano y el descendente a la inversa. El blanco fue etanol, los espectros diferenciales se compararon al restar o dividir el espectro ascendente (A) y el descendente (D). Se trató de obtener los valores donde los espectros son diferentes, lo cual revelaría un resultado interesante en cuanto a fotosensibilidad.

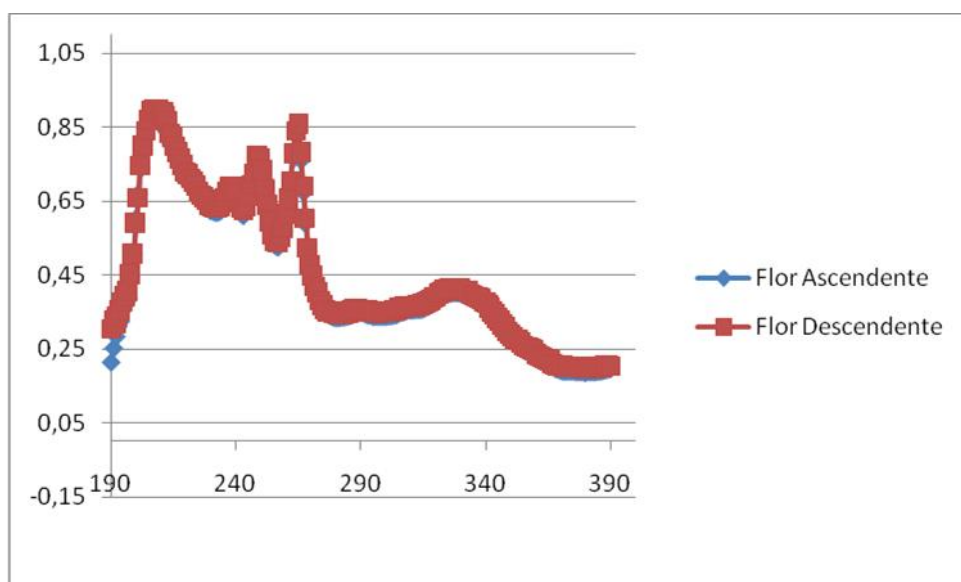
GRÁFICA 1. Espectro ascendente, descendente, resta y división, de los extractos etanólicos de flor.



A continuación se muestran las gráficas 2, 3 y 4 que corresponden a los espectros ascendente - descendente y resta - división.

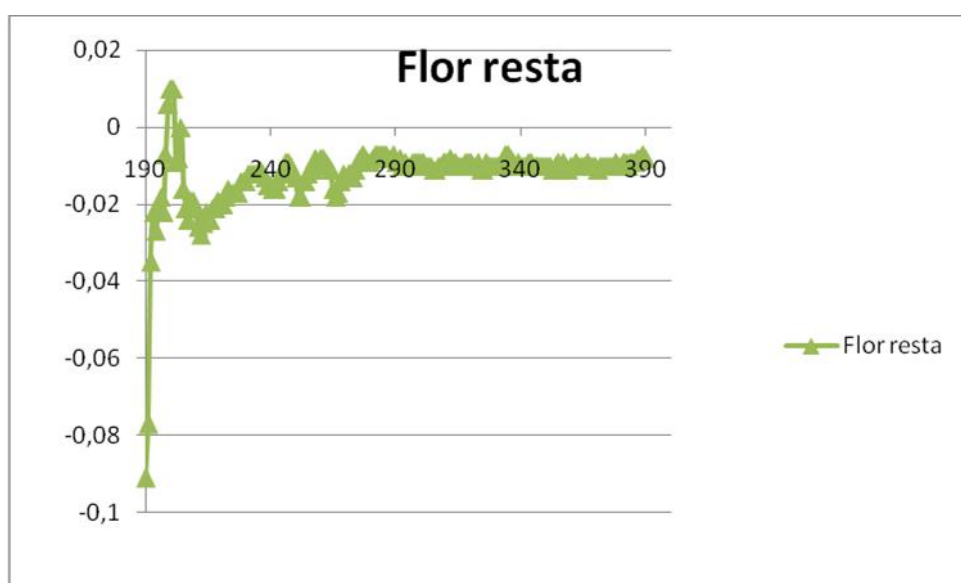
Muestra 1. Espectro del extracto etanólico de la flor de *Bidens pilosa* L. en sentido ascendente y en sentido descendente.

GRÁFICA 2. Extracto etanólico de flor (Espectro Ascendente y Descendente de 190 a 390nm)

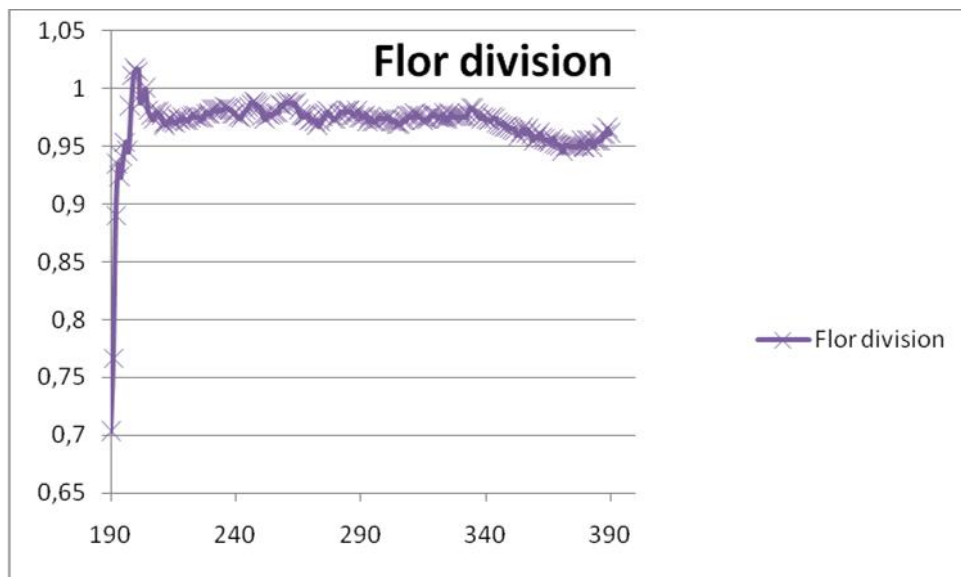


www.bdigital.ula.ve

GRÁFICA 3. Extracto etanólico de flor. Resta de los espectros Ascendentes-Descendentes (190 a 390nm).



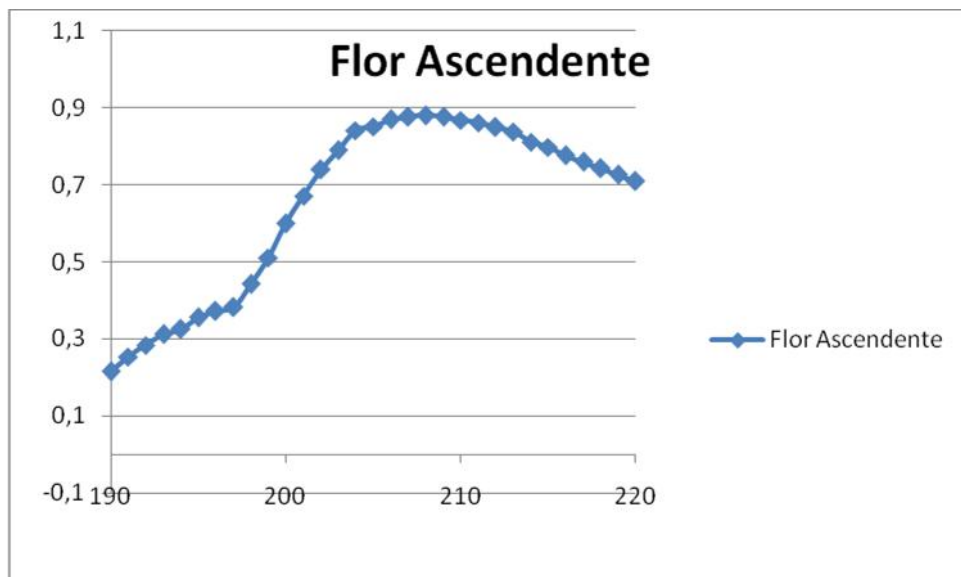
GRÁFICA 4.Extracto etanólico de flor. División de los espectros Ascendentes-Descendentes (190 a 390nm).



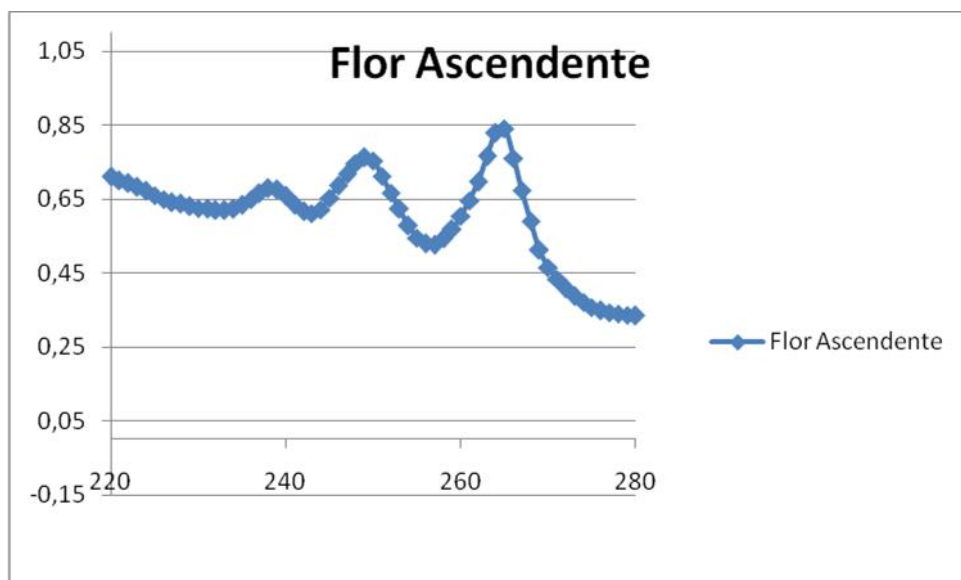
Se procedió a realizar los espectros reales y los diferenciales. Los espectros diferenciales nos permiten observar como cambian las moléculas a medida que estas van siendo irradiadas por luz, siendo irradiadas primero de manera ascendentes y por último descendentes y se graficaron. La diferencia o la división pueden arrojar un resultado en el cual el ascendente sea mayor que el descendente o a la inversa. En el primer caso se obtendrá un resultado positivo en la diferencia y mayor que 1 en la división y en el segundo se obtendrán valores a la inversa.

Los valores numéricos originales se encuentran en el anexo. Se observó que el comportamiento fue muy semejante de los espectros ascendente y descendente con una diferencia en la región de 190nm. Los espectros diferenciales arrojaron en la resta y la división, un valle a 190nm seguido de un plató entre 193-197 y un pico a 201nm. Estos resultados indican que sí hay fotosensibilidad en la región UV onda corta en el extracto de la flor, con un pico que aparece luego de que la muestra es irradiada con luz de mayor longitud de onda.

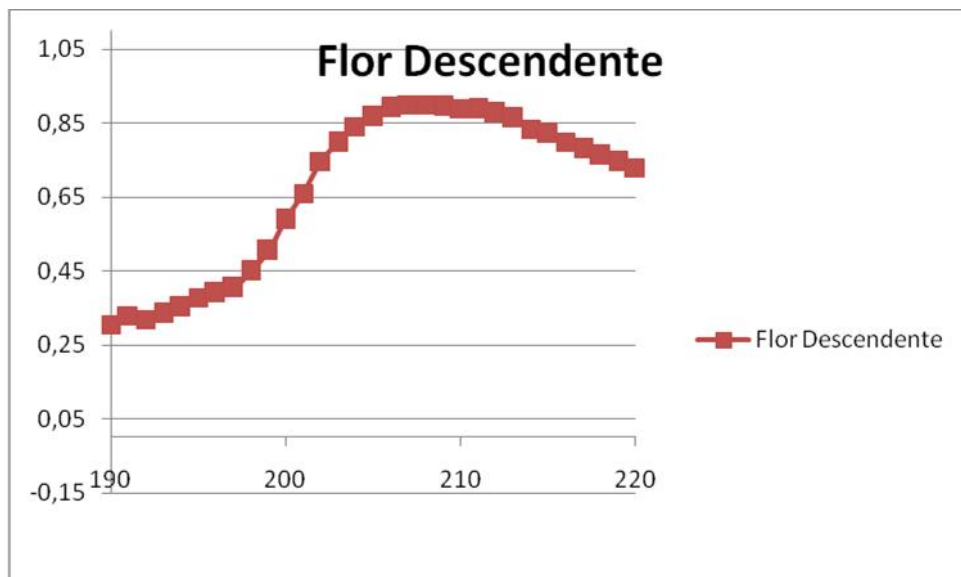
GRÁFICA 5. Extracto etanólico de flor (Ascendente de 190-220nm)



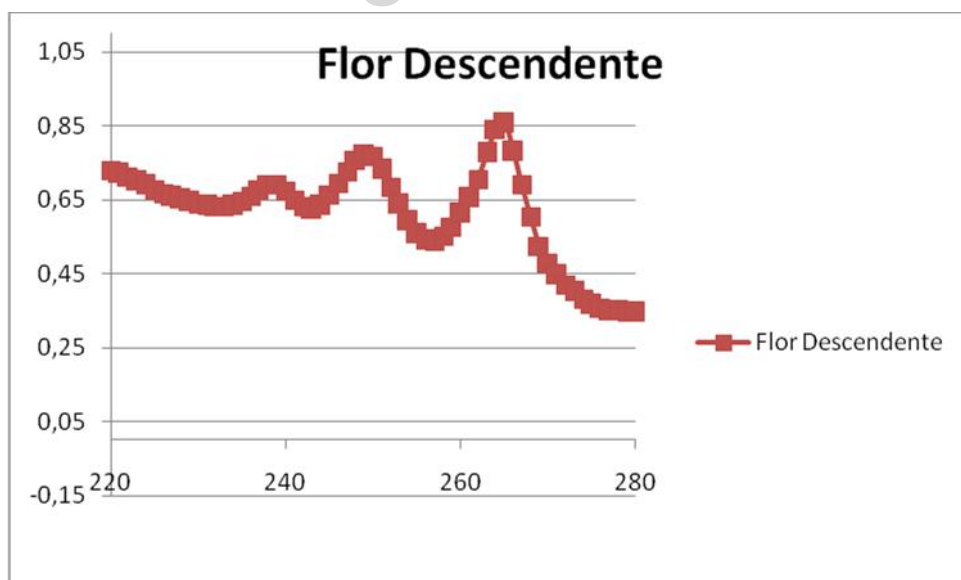
GRÁFICA 6. Extracto etanólico de flor (Ascendente de 220-280nm)



GRÁFICA 7. Extracto etanólico de flor (Descendente de 190-220nm)



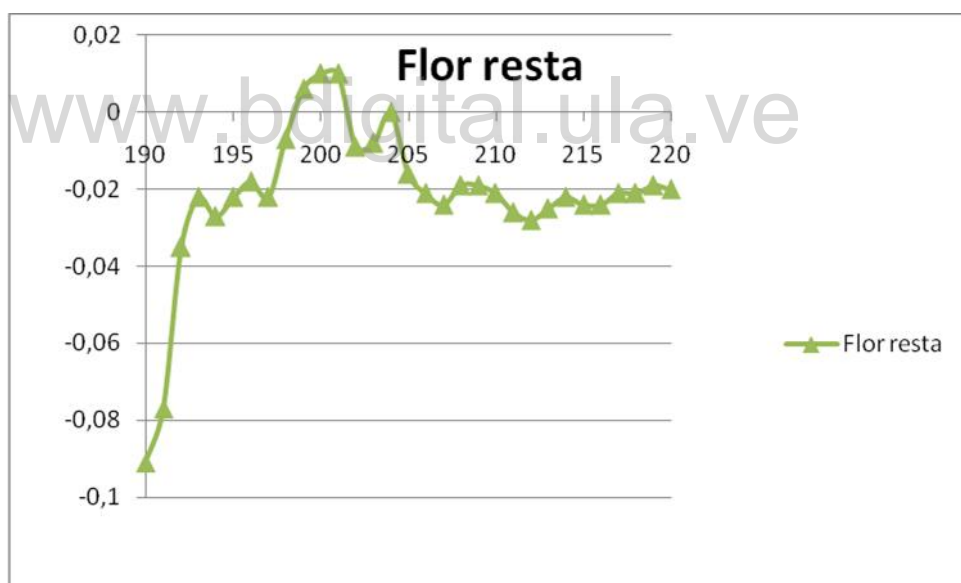
GRÁFICA 8. Extracto etanólico de flor (Descendente de 220-280nm)



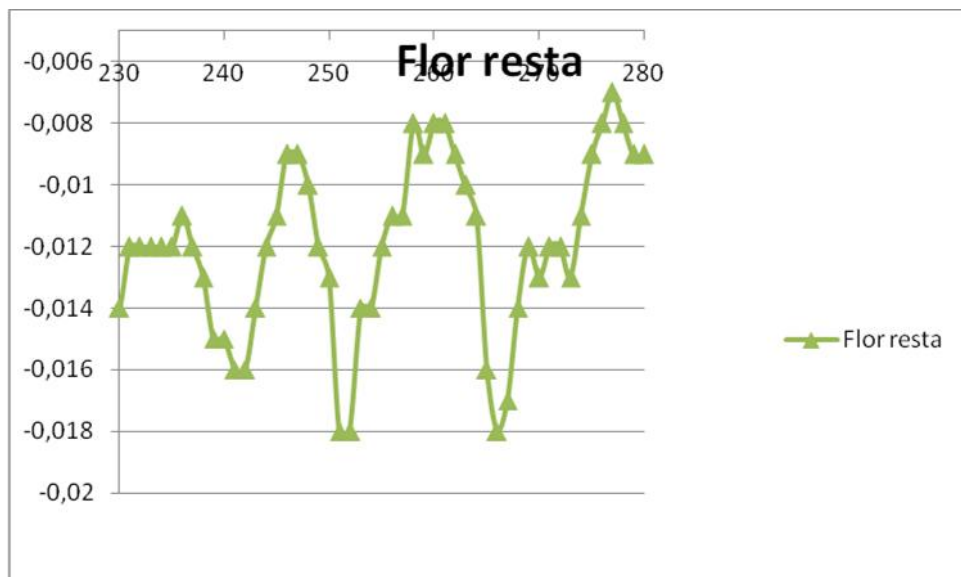
Por otra parte los valores obtenidos en los espectros diferenciales (resta y división) no están en completa sincronía o armonía energética con los picos y valles de absorción ascendente y descendente. Como nos

muestran las gráficas diferenciales 9 y 10 para resta, 11 y 12 para división, en la resta además del valle obtenido a 190nm, el plató entre 193-197 y el pico a 201nm, también se pudo notar un plató entre 231-235, seguido de un pico que se encuentra a 236nm, un valle que se ubica a 241nm y nuevamente un pico que oscila entre 246-247nm, seguidamente se aprecia otro valle entre los 251-252nm, con un penúltimo pico entre los 258-261nm, un ultimo valle al cual se denominó valle neto ya que se encuentra bien definido a 266nm y se expresa con un solo punto, un ultimo plató entre 269-273nm, y un ultimo pico a 277nm.

GRÁFICA 9. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor. (190-220nm)



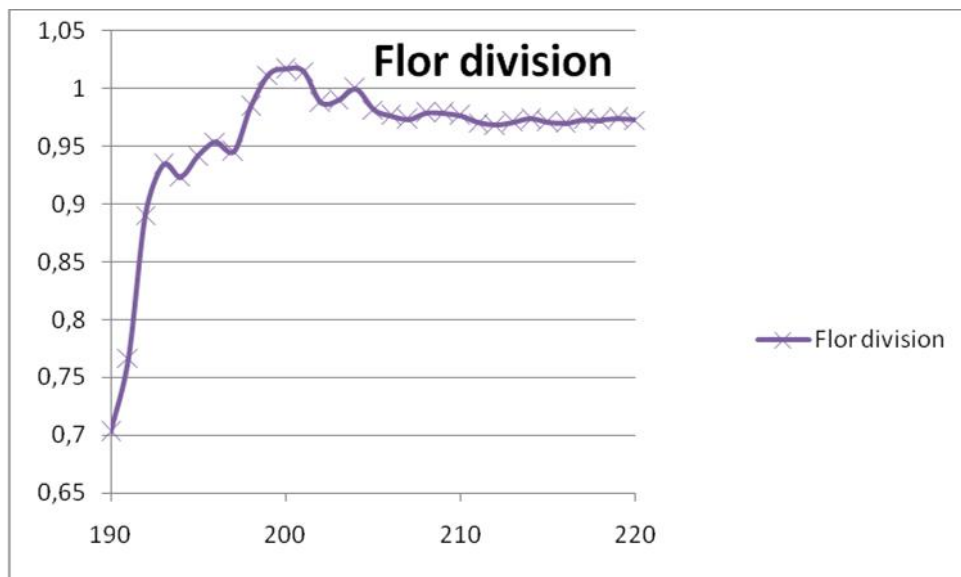
GRÁFICA 10. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor. (230-280nm)



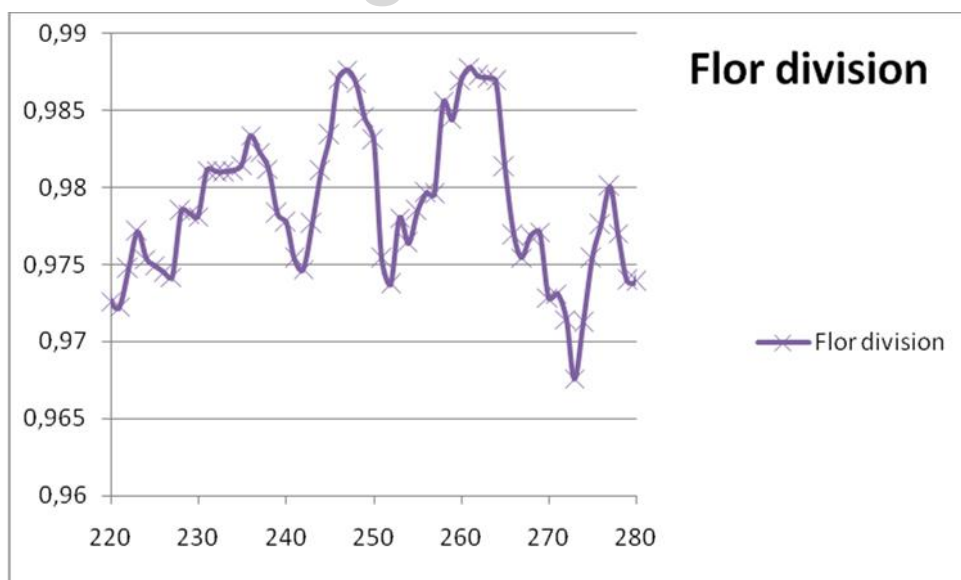
En cuanto a la división, como podemos observar en las graficas esta coincide con la resta, a excepción de la longitud de onda 266 donde en este caso encontramos un valle, pero a diferencia de la resta este no es neto, y por ultimo no existe plató entre 269-273nm, en su lugar entre dichos valores encontramos una caída.

La falta de sincronía o armonía entre los valores absolutos y diferenciales parece poner en evidencia un corrimiento hipsocrómico en estos últimos, ya que se corren hacia longitudes de ondas más bajas y de mayor energía. Esto querría decir que la fotosensibilidad se esta expresando en varias formas moleculares y de la misma manera. Estas formas moleculares absorben a 239, 249 y 265 nm en el ascendente y el descendente, mientras que en el diferencial, absorben a 236, 246 y 260 nm.

GRÁFICA 11. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor (190-220nm)



GRÁFICA 12. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de flor (220-280nm)

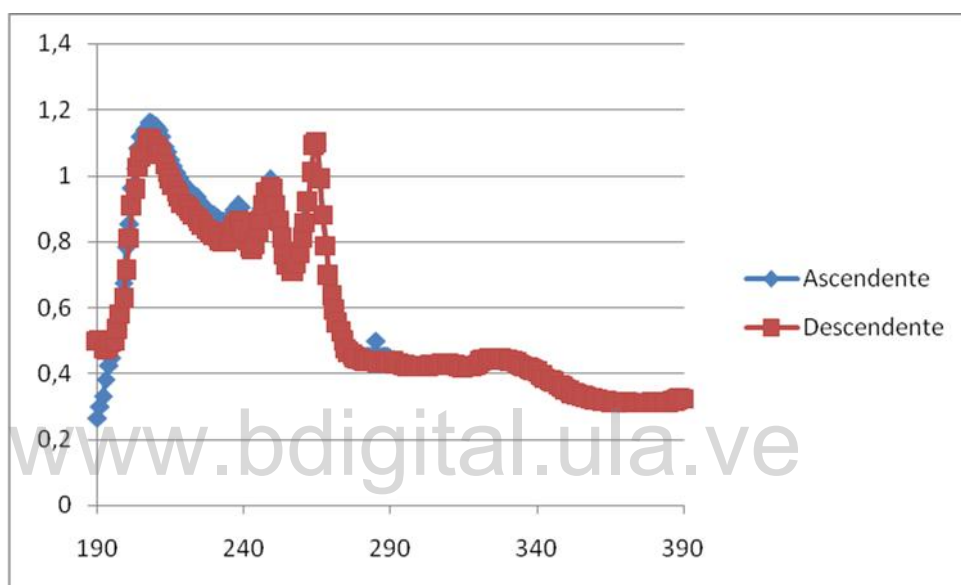


En conclusión existe una serie de picos de absorción especiales de la flor, en total son cinco (5) picos uno que se ubica a 201 nm y otros que

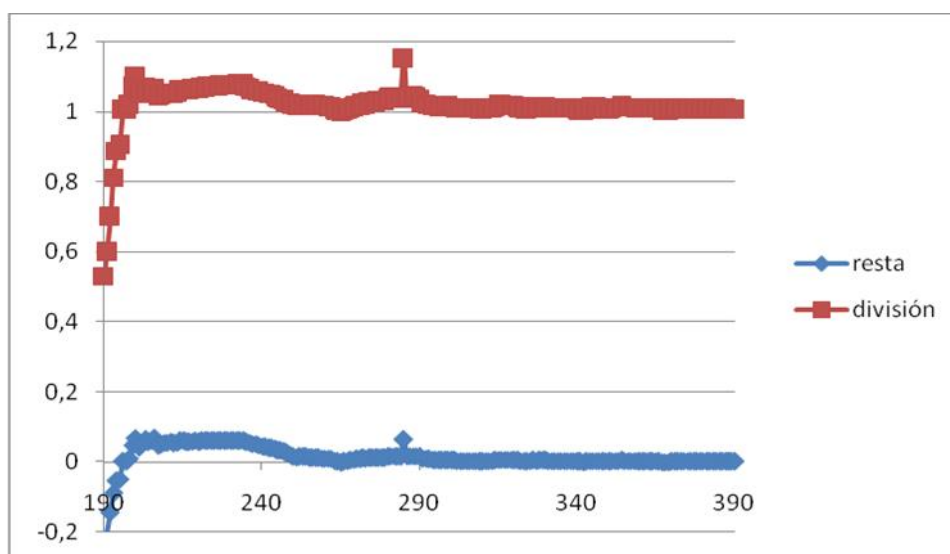
van desde 230 a 280, con tres (3) valles intermedios, haciendo referencia a que uno de los valles es neto, y por ultimo con dos (2) plató intermedios.

Muestra 2. Espectro del extracto etanólico de las hojas de *Bidens pilosa* L.

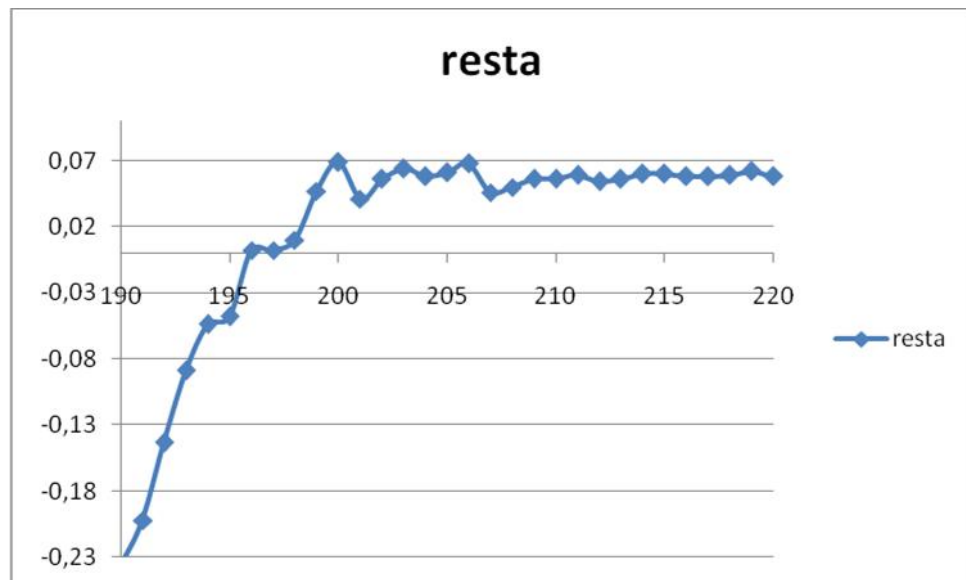
GRÁFICA 13. Espectros ascendente y descendente. Extracto etanólico de hoja (190-390nm).



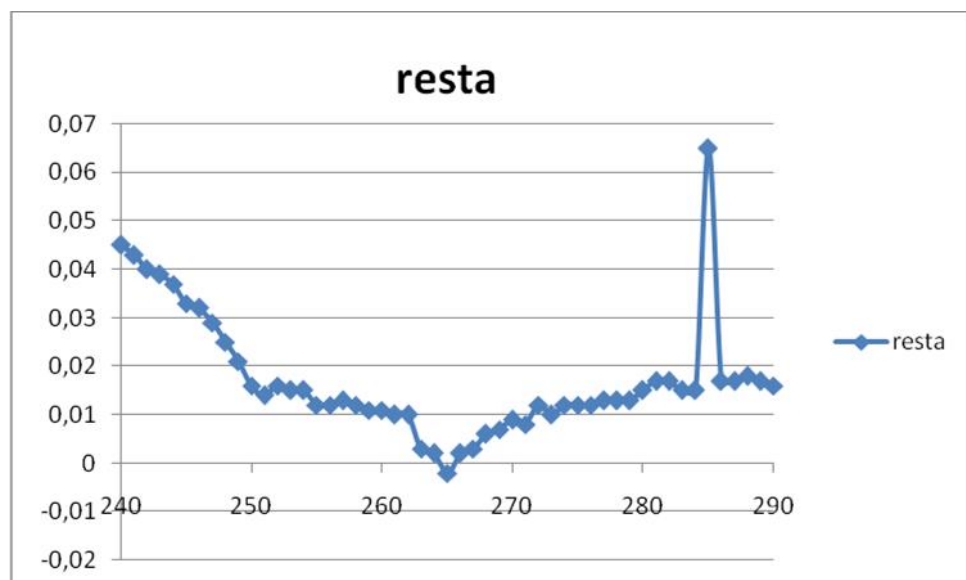
GRÁFICA 14. Espectros diferenciales (Resta y división). Extracto etanólico de hoja (190-390)



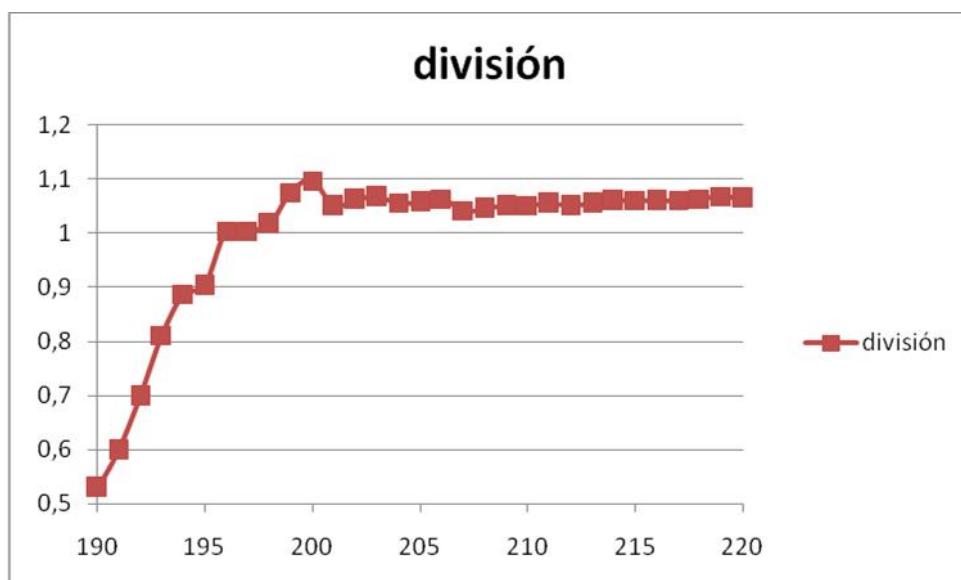
GRÁFICA 15. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de hoja (190-220nm).



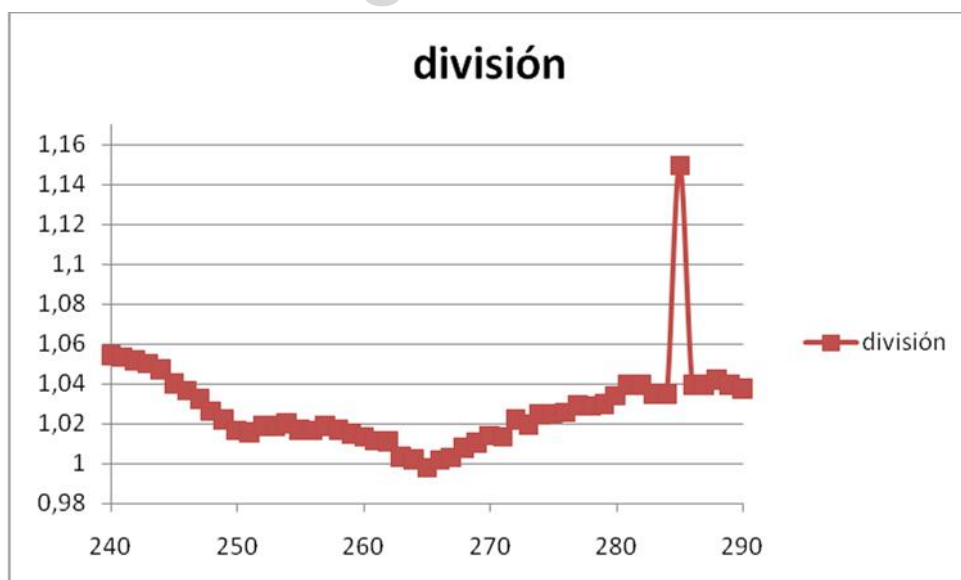
GRÁFICA 16. Resta de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de hoja (240-290nm).



GRÁFICA 17. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de la hoja (190-220nm)



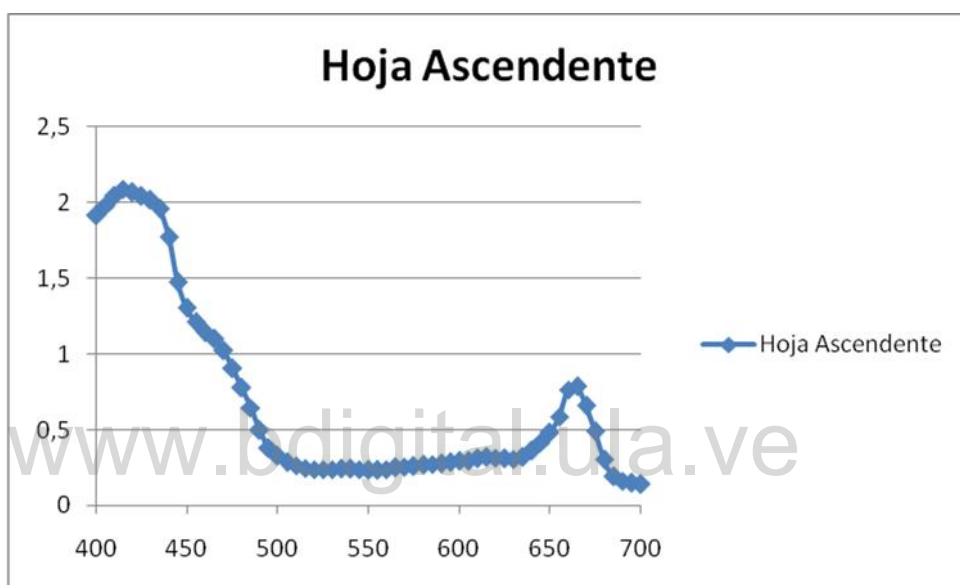
GRÁFICA 18. División de los espectros ascendentes y descendentes de los extractos etanólicos de la hoja (240-290nm)



Se procedió a realizar los espectros reales y los diferenciales y se graficaron. Los valores numéricos originales se encuentran en el anexo. En el caso de la hoja se observó que la que la fotosensibilidad se encuentra en la misma región que para el caso de la flor, se puede

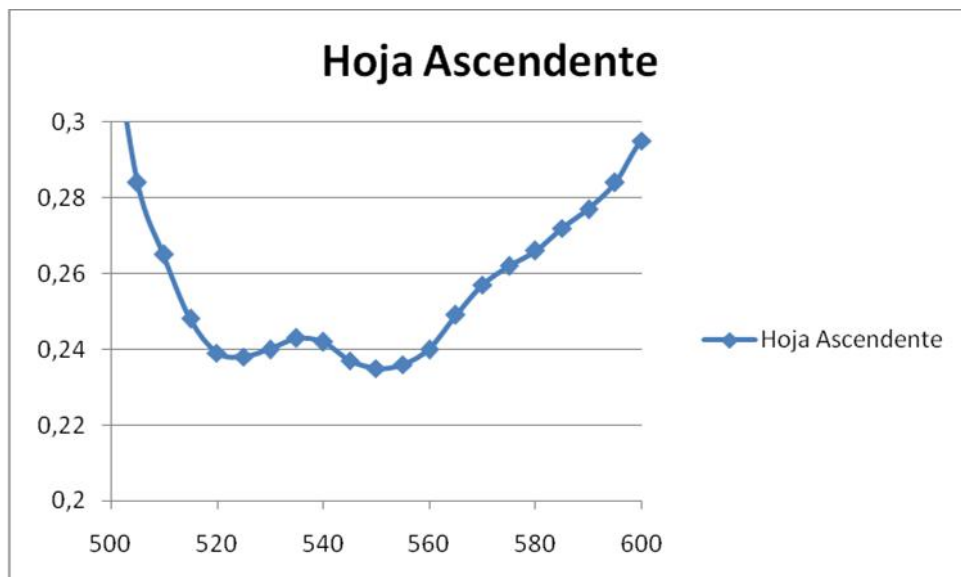
evidenciar en los espectros diferenciales, que en la región onda corta existe la presencia de un valle a 190, un pico a 201 nm y además se observa un pico en la región de 285 nm, que en el extracto de la flor dicho pico no está presente.

GRÁFICA 19. Espectro ascendente. Extracto etanólico de hoja (400-700 nm)



En este experimento se realizaron 3 corridas en la región visible una de 400 – 500 nm otra de 500 – 600 nm y de 600 a 700 nm en la búsqueda de moléculas que puedan tener fotosensibilidad además de las clorofilas. Observándose en el primer espectro las bandas de absorción de las clorofilas A y B claramente (**Gráfica 19**). Además de ellas se pudo evidenciar otro compuesto que absorbe a 530 y 545 con la formación de un pico y el cual podría ser beta-cianina o algún derivado de esta (**Gráfica 20**).

GRÁFICA 20. Espectro ascendente. Extracto etanólico de hoja (500-600 nm).



Resultados de la cromatografía.

En la tabla 10 se muestran los resultados de la cromatografía de las muestras 1 (F) y 2 (H) sembradas a diferentes concentraciones (5, 10 y 15µl) visualizadas bajo luz visible, UV onda corta (254nm) y UV onda larga (365). En la tabla 9 se muestran los R_f correspondientes a las bandas visualizadas, a las cuales se les asignó un número en orden creciente de acuerdo a su aparición.

Además en la tabla 10 se colocaron el numero de bandas con sus respectivos valores de R_f, la cantidad de extracto de flor y de hoja agregado y la condición de luz en la que la banda es más evidente, el signo positivo (+) indica la presencia y el negativo (–) la ausencia de las mismas.

Tabla 9. Referencia de las bandas cromatográficas

Número de bandas	Rf
1	0,95
2	0,91
3	0,88
4	0,86
5	0,85
6	0,81
7	0,74
8	0,62
9	0,54
10	0,51
11	0,50
12	0,47
13	0,46
14	0,44
15	0,40
16	0,34
17	0,30
18	0,29
19	0,27
20	0,23
21	0,21
22	0,19

Tabla 10. Cromatografía observada en luz visible, luz UV onda corta (254 nm) y luz UV onda larga (365nm)

No de bandas	Rf	F5			F10			F15*			H5			H10			H15		
		Lv	Oc	Ol	Lv	Oc	Ol	Lv	Oc	Ol	Lv	Oc	Ol	Lv	Oc	Ol	Lv	Oc	Ol
1	0,95	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	0,91	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,88	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	0,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5	0,85	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,81	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	0,74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	0,62	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
10	0,51	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,47	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
13	0,46	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,44	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
16	0,34	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
17	0,30	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
19	0,27	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0,23	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
21	0,21	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-

Leyenda:

- **Lv: Luz visibles**
- **Oc: Onda corta**
- **Ol: Onda larga**

Extracto de flor (5,10 y 15 ul)

Extracto de hoja (5,10 y 15 ul)

www.bdigital.ula.ve

*En primer lugar es importante acotar que las bandas observadas en el extracto F15 corresponden con F5 y F10, la diferencia en sus R_f se debe posiblemente a la concentración de la misma.

La banda 4 con un R_f de (0,86) observada solo en el extracto de hoja a luz visible, posiblemente corresponde a un compuesto denominado ficocianina.

La banda 12 con un R_f (0,47) en luz UV onda corta se observa de forma oscura en el extracto etanólico de flor, la cual podría ser una de las molécula que absorben mas entre 190 y 300nm, pudiendo esta corresponder con el pico de absorción que se encuentra a 266 nm en el espectro ascendente del extracto etanólico de flor. Por otra parte en esta misma banda, pero en el extracto etanólico de hoja, se observa como la luz UV onda corta se refleja.

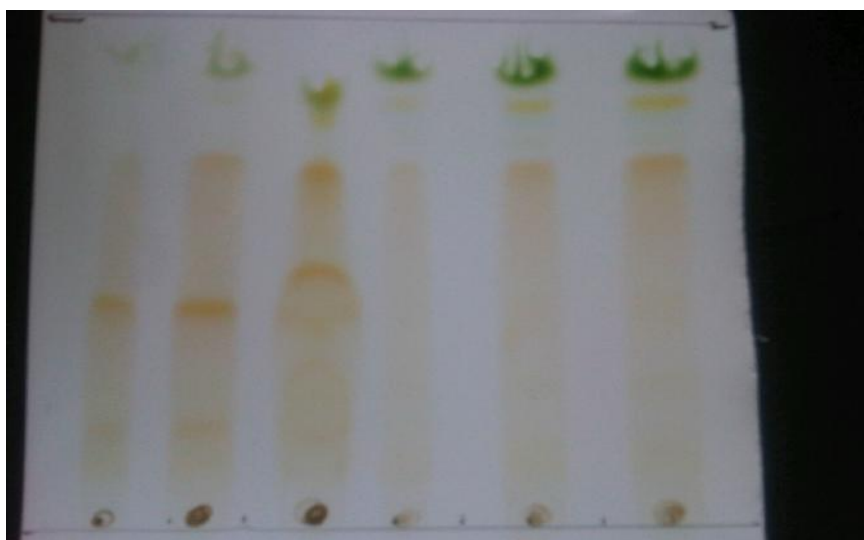


Figura 9. Cromatografía de los extractos etanólicos de flores y hojas observados en luz visible.

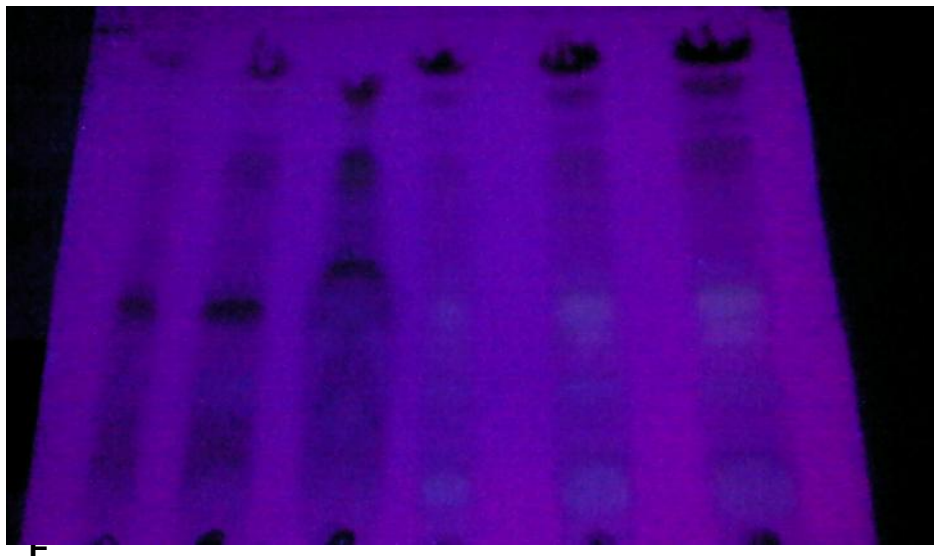


Figura 10. Cromatografía de los extractos etanólico de flores y hojas observados en luz UV onda corta (254nm).

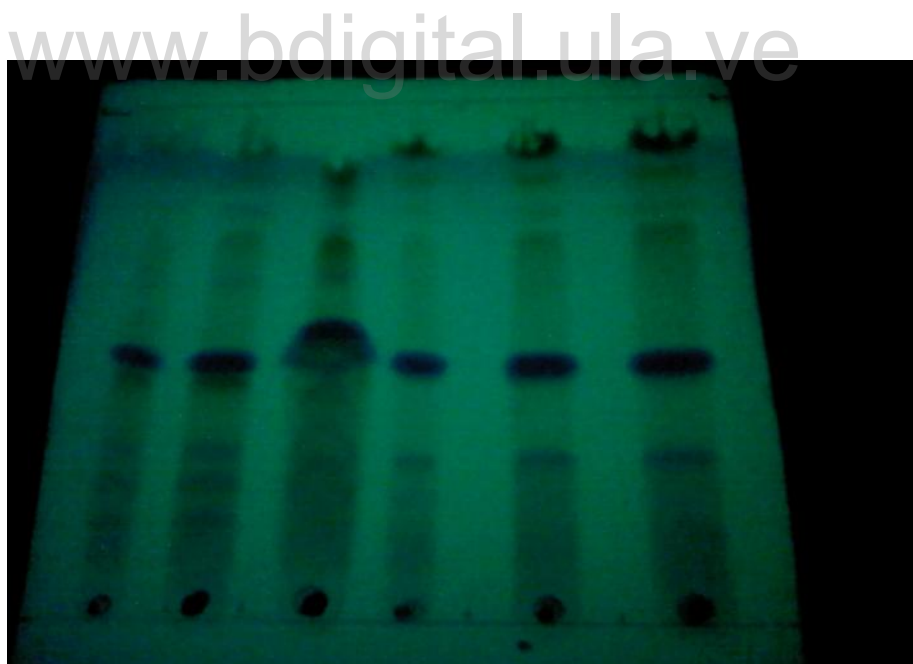


Figura 11. Cromatografía de los extractos etanólicos de flores y hojas observados en luz UV onda larga (365nm).

Determinación de las actividades biológicas (fotoprotección-UV y fototoxicidad) de los extractos etanólicos, etanólicos secos y resuspendidos en agua, de la flores y hojas de *Bidens pilosa* L., sobre la cepa de *Escherichia coli* GY5027.

Para realizar la determinación de actividad biológica de los extractos etanólicos y etanólicos resuspendidos en agua se realizaron 3 ensayos. En los tres casos se dividió una placa de petri que contenía Agar Tripticasa de Soja, en tres tercios o sectores y éstos a su vez se dividieron en 5 espacios para colocar los extractos solos, los extractos con la bacteria GY5027 y la bacteria sola **Figura 7**. En todos los casos, luego de colocar las muestras en las condiciones que se indica a continuación, uno de los tercios o sectores se irradió durante 30 segundos con lámpara UV a una distancia de 48 cm, otro se irradió con luz blanca a la misma distancia durante 5 minutos y el tercero se mantuvo en oscuridad. Todo esto se realizó con la ayuda de una plantilla que protegía los sectores que no estaban siendo irradiados. **Figura 8**.

1er ensayo (Extracto etanólico puro):

En condiciones de oscuridad se agregaron 3 ul de la cepa GY5027 (en Caldo Tripticasa de Soja) y 3 ul (0,063 ug/ul) del extracto etanólico de flor y 3 ul (0,0414ug/ul) de extracto etanólico de hoja en los sitios correspondientes y se dejó secar por 20 minutos. Se pudo observar en todos los casos, que no hubo crecimiento bacteriano, indicando que el etanol, es tóxico para las bacterias en estas condiciones. **Figura 12**.

2do ensayo (Extracto etanólico evaporado):

En condiciones de oscuridad se agregaron 3 ul del extracto etanólico de flor y de hoja (con concentraciones respectivas de 0,063 ul/ul

y 4,14 ug/ul) en los sitios correspondientes de una placa con Agar Tripticasa Soja, éste se dejó evaporar durante 5 minutos, posteriormente se sembraron 3 ul de la cepa GY5027 (en Caldo Tripticasa de Soja) en los sitios correspondientes y se dejó secar por 20 minutos. Este ensayo es una innovación ya que por primera vez en el laboratorio de Biotecnología se ensaya colocando primero el extracto, para dejar que éste difunda, penetre en el agar y se evapore el etanol, y luego se coloca la muestra de bacterias vivas. Esta metodología tiene la virtud de ejercer menos manipulación sobre la muestra a la cual se quiere proteger de la luz.

Adicionalmente encontramos que los resultados obtenidos por este método son muy similares a los que se obtienen al secar el extracto etanólico y resuspenderlo en agua. Es por ello que los resultados se discuten conjuntamente con el siguiente ensayo, poniéndose en evidencia que no hay toxicidad por parte de los extractos en la oscuridad (**figura 13 y 14**), sí hay alguna fotoprotección de los extractos cuando son sometidas las bacterias a luz UV y no existe activación de los extractos por parte de la luz blanca, por lo tanto no existe fototoxicidad. (**Ver Tablas 11, 13,15; Figura 15**).

3er ensayo (Extracto etanólico resuspendido en agua):

Se tomó 1mL del extracto etanólico de hoja y 100 ul del extracto etanólico de flor fueron secado en una estufa á 60°C durante 48 horas y resuspendido posteriormente en 100 µL de agua destilada obteniéndose los siguientes valores de concentración: extracto de la flor 21 mg/ml, extracto de las hojas 138 mg/ml.

En condiciones de oscuridad se agregaron 3 ul de la cepa GY5027 (en Caldo Tripticasa de Soja) en los sitios correspondientes se dejó secar

por 6 minutos, posteriormente se agregaron 3 ul del extracto etanólico de flor resuspendido en agua y 3 ul de extracto etanólico de hoja, (concentraciones respectivas 0,63ug/ul y 4,14ug/ul) en los sitios correspondientes.

A continuación, en las **Tablas 12, 14, 16 y la Figura 16** se muestran los resultados que pueden compararse con los resultados del segundo ensayo.

Tabla 11. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. Mantenidos en oscuridad, 2do ensayo.

Condición	Crecimiento	Inhibición	Observación
Bacteria (GY)	+1	-	
Bacteria (GY)+Flor (F)	+2	-	
Bacteria (GY)+Hoja (H)	+2	-	
Flor (F)	+	-	*bacteria diferente a la GY5027 proveniente del extracto
Hoja (H)	+	-	*bacteria diferente a la GY5027 proveniente del extracto

Tabla 12. Actividad biológica de los extractos etanólicos de flor y hoja de la planta *Bidens pilosa* L resuspendidos en agua. Mantenidos en oscuridad, 3er ensayo.

Condición	Crecimiento	Inhibición	observación
Bacteria (GY)	+3	-	

Bacteria (GY)+Flor (F)	+3	-	
Bacteria (GY)+Hoja (H).	+3	-	
Flor (F)	-	-	
Hoja (H)	-	-	

El segmento que se irradió con luz UV durante 30 segundos en condiciones que inhibirían el crecimiento de la cepa *E. coli* GY5027, altamente sensible a dicha radiación. Se observa en este caso que los extractos de flores de la planta *Bidens pilosa* L. mostraron fotoprotección – UV. Tanto en los extractos etanólicos como en los extractos etanólicos resuspendidos en agua. Este resultado se muestra en las **Figuras 17 y 18** donde se observa crecimiento bacteriano y los registros en las **Tablas 13 y 14**. También debe resaltarse que el extracto de Hoja y en algunos casos el extracto de Flor, presentaron bacteria de aspecto diferente a la GY5027.

Tabla 13. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. Bajo la acción de la luz UV.

2do ensayo.

Condición	Crecimiento	Observación	Protección
Bacteria (GY)	-		-
Bacteria (GY)+Flor (F)	+		+

Bacteria (GY)+Hoja (H).	++	Creció la bacteria GY5027 y una colonia diferente proveniente del extracto	+
Flor (F)	-		-
Hoja (H)	++	Crecimiento de bacteria diferente proveniente del extracto	-

Tabla 14. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta *Bidens pilosa* L resuspendidos en agua. Bajo la acción de la Luz UV. 3er ensayo.

Condición	Crecimiento	Observación	Protección
Bacteria (GY)	-	-	-
Bacteria (GY)+Flor (F)	+	-	+
Bacteria (GY)+Hoja (H).	-	-	+
Flor (F)	-	-	-
Hoja (H)	++	Crecimiento de bacteria diferente proveniente del extracto	-

Por otra parte, Cuando uno de los segmentos se irradió con luz blanca durante 5 minutos no se observaron efectos de activación de los extractos etanólicos y etanólicos resuspendidos en agua de la hoja y de la flor tras 24 horas de incubación. Esto se puede observar en las **figuras 19 y 20**, en la que se evidencia presencia de bacterias, y los registros se ubican en la **tabla 15 y 16**.

Tabla 15. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. Bajo la acción de la Luz blanca. 2do ensayo.

Condición	Crecimiento	Observación	Inhibición
Bacteria (GY)	+2		-
Bacteria (GY)+Flor (F)	+2		-
Bacteria (GY)+Hoja (H).	+2		-
Flor (F)	+	Crecimiento de bacteria diferente proveniente del extracto	-
Hoja (H)	+	Crecimiento de bacteria diferente proveniente del extracto	-

Tabla 16. Actividad biológica de los extractos etanólicos de la flor y hojas de la planta *Bidens pilosa* L. resuspendidos en agua. Bajo la acción de la luz blanca. 3er ensayo.

Condición	Crecimiento	Observación	Inhibición
Bacteria (GY)	+3		-

Bacteria (GY)+Flor (F)	+3		-
Bacteria (GY)+Hoja (H).	+3		-
Flor (F)	-		-
Hoja (H)	-		-

En términos generales, en el segundo y tercer ensayo se observa que no se detectó toxicidad en ninguno de los extractos mantenidos en oscuridad ni activados por la luz blanca. Sí se pudo observar una ligera fotoprotección del extracto de la flor tanto etanólico como etanólico secado y resuspendido en agua y colocado con la bacteria *Escherichia coli* GY5027 en presencia de luz UV.

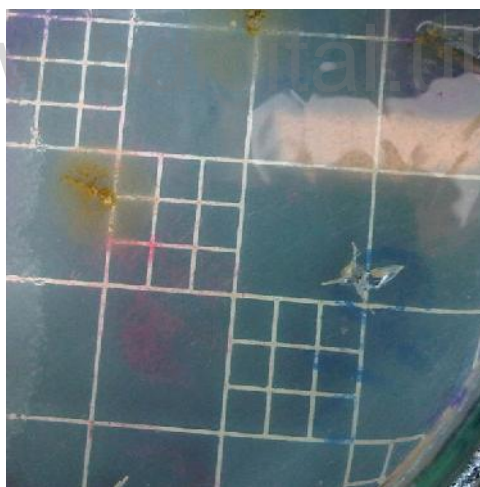


Figura 12. Primer ensayo, extracto etanólico puro. Sin crecimiento bacteriano



Figura 13. Segundo ensayo, extracto etanólico evaporado. En oscuridad.

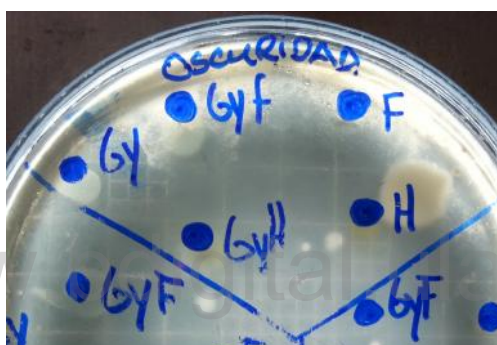


Figura 14. Tercer ensayo, extracto etanólico resuspendido en agua. En oscuridad.

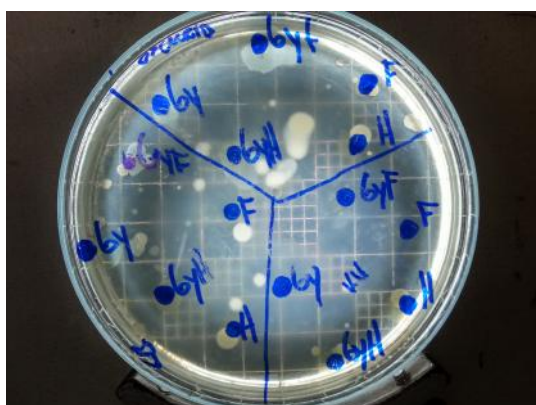


Figura 15. Segundo ensayo. Extracto etanólico evaporado de flor y hoja. En Oscuridad, bajo luz UV y luz blanca.

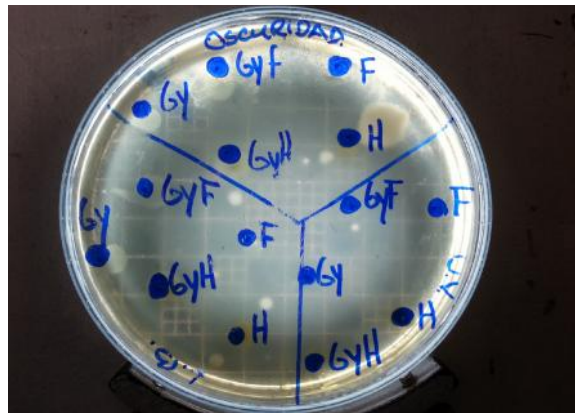


Figura 16. Tercer ensayo. Extracto etanólico de flor y hoja resuspendido en agua. En Oscuridad, bajo luz UV y luz blanca

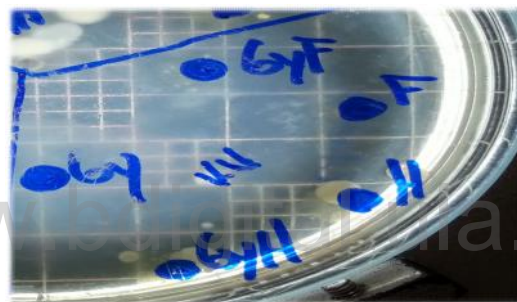


Figura 17. Segundo ensayo, extracto etanólico evaporado. Bajo la acción de luz UV.

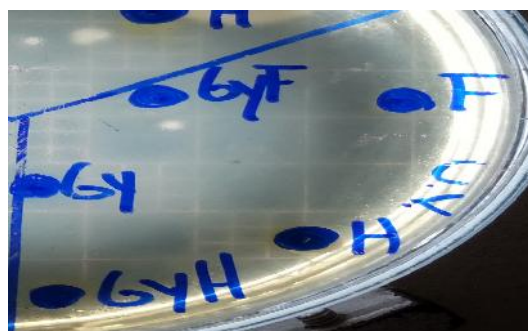


Figura 18. Tercer ensayo, extracto etanólico de flor y hoja resuspendido en agua. Bajo la acción de luz UV.

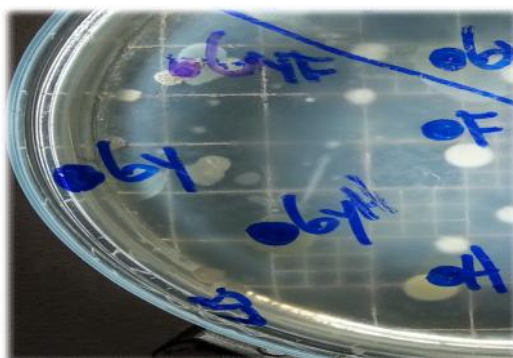


Figura 19. Segundo ensayo, extracto etanólico evaporado de flor y hoja. Bajo la acción de luz blanca



Figura 20. Tercer ensayo, extracto etanólico de flor y hoja resuspendido en agua. Bajo la acción de luz blanca.

Capítulo V

Conclusiones

En los resultados de fotosensibilidad evaluados por espectrofotometría, se demostró lo siguiente: Existe disincronía entre 190-193 nm en la absorción neta (ascendente y descendente), que esta poniendo en evidencia un compuesto fotosensible. Los espectros diferenciales arrojaron en la resta y la división, un valle a 190nm seguido de un plató entre 193-197 y un pico a 201nm. Estos resultados indican que sí hay fotosensibilidad en la región UV onda corta en el extracto de la flor, con un pico que aparece luego de que la muestra es irradiada con luz de mayor longitud de onda.

Los valores diferenciales no están en completa sincronización o armonía energética con los picos y valles absolutos ascendente y descendente lo que pone en evidencia un corrimiento hipsocrómico ya que se corren hacia longitudes de ondas más bajas y de mayor energía. Esto querría decir que la fotosensibilidad se esta expresando en varias formas moleculares y de la misma manera. Estas formas moleculares absorben a 239, 249 y 265 nm en el ascendente y el descendente, mientras que en el diferencial, absorben a 236, 246 y 260 nm.

En el análisis de resultados de la cromatografía La banda 12 con un R_f (0,47) en luz UV onda corta se observa de forma oscura en el extracto etanólico de flor, pudiendo la misma corresponder con el pico de absorción que se encuentra a 265 nm en el espectro ascendente. Por otra parte en esta misma banda, pero en el extracto etanólico de hoja, se observa como luz UV onda corta se refleja.

Finalmente en la evaluación de la actividad biológica, los extractos etanólicos puros tanto de la hoja como de la flor presentaron toxicidad

para las bacterias, por su parte en el extracto etanólico evaporado y etanólico de la hoja y flor resuspendidos en agua no se detectó toxicidad por parte de los extractos en oscuridad ni activados por la luz blanca. Sí se pudo observar una ligera fotoprotección del extracto de la flor tanto etanólico evaporado como etanólico secado, resuspendido en agua y colocado con la bacteria *Escherichia coli* GY5027 en presencia de luz UV.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

Se recomienda realizar un ensayo matemático derivado de un algoritmo denominado “análisis crítico” de Excel.

Y por último se recomienda analizar el resultado de la espectrofotometría tomando en cuenta los valles y no los picos, en virtud de que los valores mas frecuentes son los negativos.

www.bdigital.ula.ve

Referencias

Alfonso, G. (2003). Remington Farmacia. Tomo I. 20 ed. Buenos Aires. Editorial Panamericana. 686.

Apaza Ticona, L. N. (2009). Elaboración y evaluación de una forma galénica de origen vegetal con actividad fotoprotectora. Lastra, H. y Ponce, H. (2001). *Bidens Pilosa* Linné. **Revista cubana de planta medicinal**. 1:28-33.

Arias, F. (1999). **El proyecto de investigación, guía para su elaboración**. 3era edición. Editorial Episteme. Caracas. 19-25.

Cabrera H., Castro J., Grassi H. and Andrades E. Journal of Medicine and Medical Sciences (2012).

Cabrera H., Castro J., Grassi H., Andrades E. and López S. Dermatol Surg (2012). First clinical experience using chlorin derivatives in Venezuela. The effect of Photodynamic Therapy on Contiguous Untreated Tumor.

Castro, J., Cabrera, H., Grassi, C., Andrades, E. Tratamiento de Carcinoma Basocelular con terapia fotodinámica sistémica. Revista Colombiana de Cancerología 2012, v16 (3).

Dávila, J. (2010). Actividad biológica de extractos preparados a partir de la planta *Couroupta guianensis aubl.* Mérida.

Faundez, F., & Leonor, N. (2004). Fotosensibilidad de plantines de maíz (*Zea mays* L.) expuestos a radiación ultravioleta del tipo B (UV-B). Universidad De Chile, Fac. de Ciencias Agronómicas.

Gilaberte, Y., Coscojuela, C., De Santamaría, M., González, S. (2003). Fotoprotección. [Revista en línea] *Actas Dermo-siliográficas* Consultado el 20 de septiembre de 2014 en <http://www.actasdermo.org/es/fotoproteccion/articulo/13048173/>.

Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. (2006). **Metodología de la investigación**. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 4

Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. (2003). **Metodología de la investigación**. Tercera edición. Editorial Mc Graw Hill. México. 10-11.

Olaya, J y Méndez, J. (2003). **Guía de plantas y productos medicinales**. Bogotá. Convenio Andrés Bello. 11-14.

Parra, R., & del Carmen, B. (2005). Fotosensibilidad de plantines de pepino de ensalada (*Cucumis sativus* L.) expuestos a radiación ultravioleta del tipo B (UV-B). Universidad de Chile, Fac de ciencias agronómicas.

Pujol –Lereis, Mercedes, L., Bochicchio, P., Rabossi, A. (2011). Xantenos y porfirinas, moléculas fotoactivables Empleadas en el control de insectos plaga. [Revista en línea] *Revista Química Viva*. Consultado el 27 de septiembre de 2014 en <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n3/pujol.pdf>.

Sanabria L, Segovia EA, González N, Alcaraz P, Vera N de Bilbao (2009, 06). Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). **Instituto de investigación de ciencias de la salud**. 5:26-31

Tobinaga, S.; Sharma, MK.; Aalbersberg, GT.; Watanabe, K.; Iguchi, K.; Narvi, K. et al. VI (2009, 03,04). Isolation and identification of a potent anti-malarial polyacetylene and bacteria from the plant *Bidens pilosa* L.; ***Plantae medical.*** 75: 624-8.

Trujillo, S. y Madrigal, B. (2005). **Plantas antimaláricas de Tumaco, costa pacífica colombiana.** Medellín. Editorial de la Universidad de Antioquia, Colombia. 60.

Vitale, M. (2002). Fotoprotección: conceptos básicos y actualización. [Revista en línea] Revista Peruana de Dermatología. Consultado el 20 de septiembre de 2014 en

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v12_n2/fotoproteccion.htm

<http://perso.wanadoo.es/sergioram1/espectrofotometria.htm>

En la Sección de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes (IIFFB-ULA) se han realizado trabajos afines a la presente investigación, entre ellos están:

Aldana R., Páez D. (2014). *Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de extractos etanólicos de la hoja y epitelio de Annona muricata.* Tesis de grado de la Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutor Prof. Efrén Andrades.

Flores M. (2014). *Evaluación preliminar de la fotoactivación y fototoxicidad del acíbar de plantas de Sábila.* Tesis de grado de la Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutor Prof. Cristina Grassi.

Méndez J., Rosales, D. (2013). *Moléculas potencialmente fotosensibles, fotoactivables en el zumo de la pulpa madura, verde y hojas del noni, Morinda citrifolia*. Tesis de grado de la Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutor Prof. Efrén Andrades.

Rey K. (2014). *Extracto etanólico de flor de Moringa (Moringa oleifera)*. Tesis de grado de la Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutor Prof. Efrén Andrades.

Soto D., López F. (2012). *Estudio de la fotosensibilidad y fotoprotección de los extractos acuosos y etanólicos de la pulpa madura y verde de los frutos de Couroupita guianensis Aubl*. Tesis de grado de la Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutor Prof. Efrén Andrades.

Vielma Y. (2014). *Estudio de los extractos etanólicos de la semilla y vaina de Moringa (Moringa oleifera)*. Tesis de grado de la Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutor Prof. Efrén Andrades.

Contreras R. (2012). *Actividad tóxica de acíbar de Aloe vera y sus componentes sobre bacterias*. Tesis de grado de la Escuela de bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutor Prof. Cristina Grassi

Anexos

www.bdigital.ula.ve