

Potencial De Extractos De Especies Plantas De La Diversidad Colombiana Como Filtros
Solares De La Radiación Ultravioleta.

Diego Armando Villamizar Mantilla

Trabajo De Grado Presentado Como Requisito Para Optar El Título De
Biólogo

Tutor

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

PhD. en Ciencias Agrícolas

Cotutor

Dr. Luis Alberto Núñez De Villavicencio Martínez

Físico

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Ciencias Básicas

Escuela De Biología

Bucaramanga

2018

Tabla De Contenido

	Pág.
Introducción	8
1. Objetivos De La Pasantía.....	12
1.1 Objetivo General Del Pasante	12
1.2 Objetivos Específicos.....	12
2. Competencias Que Desarrolló El Pasante.....	13
3. Metodología Para El Desarrollo De Las Competencias.	13
3.1 Material Biológico	13
3.2 Preparación Solución Stock	13
3.2.1 Extractos Vegetales.....	14
3.2.2 Componentes Puros.....	14
3.2.3 Crema Fotoprotectora Estándar.....	14
3.3 Preparación Soluciones De Trabajo	15
3.3.1 Extractos Vegetales.....	15
3.3.2 Componentes Puros.....	15
3.3.3 Crema Fotoprotectora Estándar.....	16

3.4	Irradiación De Soluciones	16
3.5	Análisis Espectrofotométrico	16
3.6	Determinación De Índices <i>In Vitro</i> De Protección Solar	17
4.	Resultados	19
5.	Discusión.....	24
6.	Conclusiones	26
	Bibliografía	28
	Lista De Apéndice.....	36

RESUMEN

TÍTULO: POTENCIAL DE EXTRACTOS DE ESPECIES PLANTAS DE LA DIVERSIDAD COLOMBIANA COMO FILTROS SOLARES DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

AUTOR: DIEGO ARMANDO VILLAMIZAR MANTILLA **

PALABRAS CLAVES: FOTOPROTECCIÓN, EXTRACTOS VEGETALES, SPF-IN.VITRO, PF-UVA-IN-VITRO, (LAMBDA CRÍTICO), R (RADIO)

DESCRIPCIÓN:

EL objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la capacidad fotoprotectora de los 47 extractos vegetales de plantas de la biodiversidad Colombiana y de 10 componentes puros de los constituyentes mayoritarios de estos extractos. La medición de los rayos ultravioleta en las muestras de extractos y los componentes puros se realizó mediante métodos espectrofotométricos. La fotoprotección in-vitro y la fotoestabilidad se evaluó de acuerdo a los siguientes parámetros: Factor De Protección Solar ($SPF_{in-vitro}$), Factor De Eficacia Protectora UVA (PF-UVA), Lambda Crítico (λ_c) y Radio (R) antes y después de irradiar con UV. Los resultados obtenidos indicaron fotoprotección en un porcentaje importante en los extractos vegetales (44.7%) para UVB y, para UVA en solo 5 extractos vegetales dentro de las familias Myrtaceae, Lamiaceae y Piperaceae. Para los componentes puros indicó fotoprotección solo para las combinaciones de Apigenina y B-cariofileno en las diferentes zonas espectrales UVB y UVA. También se demostró una correlación positiva y moderada entre los índices de fotoprotección in-vitro y el índice de daño genético. Se concluyó que las plantas de la biodiversidad Colombiana son una potencial fuente de compuestos fotoprotectores contra la radiación ultravioleta y, que su capacidad fotoprotectora puede estar soportada por las combinaciones de algunos de sus componentes mayoritarios como la Apigenina y B-cariofileno.

*Trabajo De Grado

**Facultad De Ciencias, Escuela De Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, PhD.
en Ciencias Agrícolas

ABSTRACT

TITLE: POTENTIAL OF EXTRACTS OF SPECIES COLOMBIAN DIVERSITY
PLANTS AS SOLAR FILTERS OF ULTRAVIOLET RADIATION

AUTHOR: DIEGO ARMANDO VILLAMIZAR MANTILLA **

KEYWORDS: PHOTOPROTECTION, PLANTS EXTRACTS, SPF-
IN.VITRO, PF-UVA-IN-VITRO, (LAMBDA CRÍTICO), R (RADIO)

DESCRIPTION:

The aim of our study was to investigate the photoprotective activity of 47 plant extracts of Colombian biodiversity plants and of 10 pure components of the major constituents of these extracts. The ultraviolet rays (UV) transmission of extract's simple and pure components was made by spectrophotometric methods. In vitro photoprotection efficacy and photostability were evaluated according to the following parameters: sun protection factor *in-vitro* (SPF *in.vitro*), UVA protection factor *in-vitro* (PF-UVA *in-vitro*), UVA/UVB ratio and critical wavelength (λ_c) before and after UV irradiation. The results obtained showed photoprotection in a significant percentage of plant extracts (44.7%) for UVB and for UVA in only 5 plant extracts within the families Myrtaceae, Lameaceas and Piperaceaes. For the pure components, it indicated photoprotection only for the combinations of Apigenin and β -Caryophyllene in the different UVB and UVA spectral zones. A positive and moderate correlation was also demonstrated between the in vitro photoprotection index and the genetic damage index. It was concluded that Colombian biodiversity plants are a potential source of photoprotective compounds against ultraviolet radiation and, that its photoprotective capacity can be supported by the combinations of some of its major components such as Apigenin and β -Caryophyllene.

* **Bachelor Thesis**

****Facultad De Ciencias, Escuela De Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo, PhD.**
en Ciencias Agrícolas

Introducción

La radiación ultravioleta (UV) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel. En las poblaciones humanas, la incidencia de estos rayos produce diferentes efectos biológicos como: hiperpigmentación, eritemas, envejecimiento prematuro de la dermis y la epidermis y el cáncer de piel (Karol, 2009). De todas la enfermedad relacionada con la sobre exposición a la radiación solar, el cáncer de piel es la de mayor importancia. Su prevalencia se ha incrementado a nivel mundial en la última década por diversos factores como: estilo de vestir, actividades laborales con mayor exposición al sol y deterioro de la capa de ozono, entre otros (Leiter y Garbe, 2008).

La radiación UV se clasifica de acuerdo con su zona espectral como sigue: radiación ultravioleta C (UVC; desde los 200 – 280nm), radiación ultravioleta B (UVB; 280 – 320nm) y radiación ultravioleta A (UVA; 320-400nm). La UVC es absorbida totalmente por la capa de ozono; mientras que el 5% y 95% de la UVB y UVA, respectivamente, alcanzan la superficie terrestre (Matsumura y Ananthaswamy, 2004). La UVB es responsable de la mayoría de efectos deletéreos causado por la radiación solar en la piel de humanos (Pfeifer y Besaratinia, 2012). En las personas expuestas de forma aguda a la UVB, las células de la piel experimentan daños en su ADN, principalmente Dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y (6-4) pirimidina pyrimidone (6-4PP) (Pfeifer, 1997). los cuales causan mutaciones que pueden conducir a respuestas inflamatorias, inmunosupresión y cáncer de piel (Ikehata y Ono, 2011; Vink y Roza, 2001; Wikonkal y Brash, 1999; Zaidi, Day y

Merlino, 2008). También la UVA contribuye a estos daños al ADN, principalmente con la formación de especies reactivas de oxígeno; las cuales además contribuyen al desarrollo de tumores (López *et al.*, 2011). Es por esto, que un protector o bloqueador solar ideal debe contribuir a la protección de la piel en las zonas espectrales con significación biológica (UVA y UVB) de manera estable y segura (Fourtanier, Moyal y Seité, 2008).

En busca de nuevas alternativas que sirvan como bloqueadores o filtros solares, las plantas constituyen una fuente importante de compuestos útiles para la formulación de nuevos fotoprotectores de amplio espectro que contrarresten el daño en el ADN generado por la UV. Múltiples compuestos con propiedades antioxidantes se han hallado en extractos vegetales; los cuales muestran potencial fotoprotector como son: resveratrol, vitamina E, la vitamina C y epigalocatequina-3-galato, entre otros (Matsui *et al.*, 2009). Entre los extractos vegetales que muestran potencial fotoprotector al nivel experimental se encuentran: extracto de té verde, extracto de tamarindo, aceite de palmas, entre otros (Elmets *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Kuchel *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006; Stahl y Sies, 2007).

La eficacia de un protector es evaluada usando distintos métodos. El factor de protección solar *in vivo* (SPF_{in vivo}, de sus siglas en inglés) es el método estándar internacional más aceptado para evaluar la eficacia de la protección solar (Godar, 2011). Este método se basa en la medición *in vivo* del eritema en piel expuesta a UV y se define como el número de veces (en horas) que un bloqueador o protector solar retarda la aparición del eritema o aumenta la capacidad de defensa de la piel frente a la exposición a UV (Kluschke *et al.*, 2014). El SPF también puede calcularse usando métodos *in vitro* basados en datos de absorción espectral de los compuestos fotoprotectores y de irradiancia solar global (Ferrero, Pissavini, Dehais, Marguerie y Zastrow, 2007). El método SPF_{in vitro} se calcula usando el modelo descrito por Sayre; el cual se basa en valores de transmitancia UV

del bloqueador solar y en datos standard de dosis mínima de radiación solar que produce eritema en la piel humana (Sayre, Agin, LeVee, y Marlowe, 1979). EL $SPF_{in vitro}$ ajustado se calcula de manera similar al $SPF_{in vitro}$, pero considerando un coeficiente de corrección (coeficiente C) que ajusta los valores $SPF_{in vitro}$ a los valores de $SPF_{in vivo}$ (COLIPA, 2011). Según recomendaciones de la Comisión Europea, los niveles de fotoprotección determinado con el índice $SPF_{in vitro}$ se clasifican en 4 categorías (European Commission, 2006b). Estas son: Categoría I (SPF entre 6 - 14.9) o protección baja, Categoría 2 (SPF entre 15-29.9) o protección media, Categoría 3 (SPF entre 30 - 59.9) o protección alta y Categoría 4 (SPF mayor o igual a 60) o protección muy alta.

Adicionalmente, el factor de eficacia fotoprotectora para UVA ($PF-UVA_{in vitro}$, de sus siglas en inglés), es un método que relaciona la transmitancia *in vitro* de la sustancia evaluada y el índice de oscurecimiento pigmentario persistente (PPD) *in vivo* durante la estimación de la fotoprotección. Siguiendo las recomendaciones de la Comisión Europea, un indicativo de alto nivel de fotoprotección se logra cuando este índice es como mínimo 1/3 del $SPF_{in vitro}$ (European Commission, 2006b; Wang, Stanfield y Osterwalder, 2008).

Otro índice ampliamente usado es la longitud de onda crítica (λ_c), el cual se refiere al 90% del área bajo la curva de extinción para la zona espectral UVB-UVA (290-400nm) alcanzada para una muestra dada (Herzog *et al.*, 2002; COLIPA, 2007). La eficacia de este índice se evalúa de acuerdo con las recomendaciones de Diffey y siguiendo un sistema de clasificación por estrellas como sigue: Cero estrellas (λ_c menor a 325 nm), una estrella (λ_c entre 325 – 334 nm), dos estrellas (λ_c entre 335 – 349 nm), tres estrellas (λ_c entre 350 – 369 nm) y cuatro estrellas (λ_c mayor o igual a 370 nm) (Diffey, 1994).

Por último, el radio UVA/UVB (R) es otro índice usado para evaluar la fotoprotección de un bloqueador solar. Este índice caracteriza la forma de los espectros en término de la cantidad de la

cobertura UVA y la cantidad de la cobertura UVB; reduciendo la información espectral a un número (Jarzycka, Lewińska, Gancarz, y Wilk, 2013). La eficacia de R se mide de acuerdo con las recomendaciones de Diffey y siguiendo un sistema de clasificación por estrellas como sigue: Cero estrellas ($R < 0.2$), una estrella (R entre 0.20 – 0.39), dos estrellas (R entre 0.40 – 0.59), tres estrellas (R entre 0.60 – 0.79) y cuatro estrellas ($R \geq 0.8$) (Diffey, 1994).

La presente pasantía de investigación tuvo como propósito evaluar la capacidad de diferentes extractos vegetales (50) y de alguno de sus constituyentes químicos (10), para absorber fotones de la UV usando diferentes índices de fotoprotección. Los extractos que se evaluaron fueron obtenidos en el marco del proyecto: RC-0572-2012. Estudio del potencial antigenotóxico frente a la radiación ultravioleta de extractos SFE y aceites esenciales de especies vegetales de la biodiversidad Colombiana.

1 Objetivos De La Pasantía.

1.1 Objetivo General Del Pasante

Evaluar la capacidad de absorción de fotones UV de extractos vegetales de plantas colombianas usando métodos espectrofotométricos.

1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la absorbancia de diferentes extractos vegetales y constituyentes puros en el rango espectral UV mediante el método espectrofotómetro.
- Determinar el potencial de los extractos como filtros solares usando diferentes métodos *in vitro* de protección solar.
- Relacionar los resultados obtenidos con los métodos *in vitro* de protección solar y con los índices que miden reducción de daño inducido por UV en el ADN celular como el SOS chromotest.

2 Competencias Que Desarrolló El Pasante.

- Desarrolló habilidades en el manejo de equipos y en la preparación de materiales de laboratorio y de soluciones para análisis espectrofotométrico.
- Desarrolló habilidades en el análisis de datos
- Analizó e interpretó resultados de la investigación científica
- Mejoró sus habilidades de escritura y divulgación de información científica.

3 Metodología Para El Desarrollo De Las Competencias.

3.1 Material Biológico

Los 50 extractos vegetales usados en la presente pasantía fueron suministrados por el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) en el marco del proyecto Bio-Red-CO-CENIVAM No. RC-0572-2012.

3.2 Preparación Solución Stock

3.2.1 Extractos Vegetales

Inicialmente, se pesaron 30 mg de cada extracto vegetal y se diluyeron en un volumen de 1 mL de metanol en tubo de Eppendorf, la solución se agitó en vórtex durante 30 segundos y se le aplicó ultrasonido durante 30 minutos en un baño ultrasonido E30H Elmasonic (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemania). La solución se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm en una centrifuga 5424/5424R (Eppendorf, Hamburg, Alemania). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf que se almacenó en frío (4-8°C) y en la oscuridad hasta su uso.

3.2.2 Componentes Puros

Se prepararon soluciones stock de 10 compuestos puros (apigenina (95%), carvacrol (98%), β -cariofileno (98%), *p*-cimeno (99%), curcumina (94%), epigallocatequina galato (95%), naringenina (95%), pinocebrina (95%), quercitina (95%) y timol (99%); los cuales fueron previamente identificados como componentes mayoritarios de los extractos (Stashenko, Martínez, Cala, Durán y Caballero, 2013). Todos los compuestos fueron obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA). Las soluciones stock (10 mL), se prepararon a una concentración de 50 mg/mL en metanol.

3.2.3 Crema Fotoprotectora Estándar

En el estudio se usó la crema bloqueadora solar comercial (EauThermale Avene SPF50+, Paris, Francia) como un estándar para fotoprotección, contra el cual se comparó la actividad de los

compuestos estudiados. A tales fines, se preparó un extracto del producto disolviendo 1 mL de metanol en tubo de Eppendorf, siguiendo lo descrito en el acápite 3.2.1. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf que se almacenó en frío (4-8°C) y en la oscuridad hasta su uso.

3.3 Preparación Soluciones De Trabajo

3.3.1 Extractos Vegetales

Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de las soluciones stock de cada extracto, en un rango de concentración entre 0.06 – 0.75 mg/mL, usando como disolvente agua destilada estéril y para un volumen final de 1.5 mL de solución.

3.3.2 Componentes Puros

Las soluciones de trabajo de los compuestos se llevaron a cabo en agua destilada estéril a concentraciones que estuvieron en rangos de concentraciones dependiendo del compuesto como sigue: apigenina (0,03024 - 0,12076 mg/mL), carvacrol (1,90605 - 7,624 mg/mL), β -cariofileno (0,3898 - 1,5594 mg/mL), *p*-cimeno (1,744 - 6,976 mg/mL), curcumina (0,006072 - 0,024288 mg/mL), epigalato catequina (0,0494 - 1,1978mg/mL), naringenina (0,082688 - 0.3307 mg/mL), pinocembrina (0,00768 - 0,03072 mg/mL), quercitina (0,015704 - 0,062816 mg/mL) y timol (1,256 - 5,0258 mg/mL). Dichas soluciones, se prepararon para un volumen final de 1.5 mL de solución.

3.3.3 Crema Fotoprotectora Estándar

Las soluciones de trabajo de la crema bloqueadora solar fueron diluciones seriadas agua destilada estéril, considerando el extracto obtenido en el acápite 3.2.3 como el 100%. Dichas soluciones, se prepararon para un volumen final de 1.5 mL de solución.

3.4 Irradiación De Soluciones

En cada caso, se dispensó 1 mL de solución de trabajo del extracto o compuesto en placas de Petri de 9 cm de diámetro, con el fin de obtener una capa poco profunda de estas (~ 1,1 mm). La irradiación se llevó a cabo en una cámara de irradiación UVA (320–400 nm) / UVB (280–315nm) BS-02 (Dr. Grobel UV-Elektronik GmbH, Alemania); equipada con un controlador de radiación UV-MAT de la misma casa comercial. Funcionando al 100% de intensidad, las lámparas UVB de la cámara de irradiación presentan un valor de irradiancia de $4\text{mW}/\text{cm}^2$. La dosis aplicada fue de $10\text{ J}/\text{m}^2$ de UVB; la cual fue previamente usada para estudiar el efecto antígenotóxico de los extractos aquí evaluados (Fuentes *et al.*, 2017)

3.5 Análisis Espectrofotométrico

Con el fin de conocer los espectros de absorbancia de los extractos y compuestos previo y posterior a la irradiación con UVB, se usó la función Skanlt 3.2 de un espectrofotómetro tipo Multiskan GO (Thermo Scientific, MA, USA) para escanear un rango espectral entre 200 y 400

nm. Las mediciones de absorbancia de las soluciones (1.5 mL) se llevaron a cabo por triplicado en una cubeta de cuarzo (Hellma Analytics, ASchaffenburg, Alemania) con las siguientes especificaciones: grosor del cristal (1,5 mm), largo (5 cm), ancho (1 cm), profundidad (1 cm) y con una capacidad o un volumen total (3,5 mL). Los valores medio de absorbancia obtenidos para el rango espectral UV y sus correspondientes errores estándar, se graficaron considerando un paso de $\lambda = 10$ usando el programa *ggplot2* de la plataforma R (R Core Team, 2013).

3.6 Determinación De Índices *In Vitro* De Protección Solar

Los índices de protección se calcularon básicamente según lo indicado por Jarzyka (Jarzycka *et al.*, 2013). Los valores *in vitro* de $SPF_{in vitro}$ y $PF-UVA_{in vitro}$ se calcularon de acuerdo con las ecuaciones No. 1 y 2 (Hojerová, Medovčíková y Mikula, 2011; Velasco *et al.*, 2008):

$$SPF_{in vitro} = \frac{\int_{280}^{400} E_{\lambda} \cdot I_{\lambda} \cdot d\lambda}{\int_{280}^{400} E_{\lambda} \cdot I_{\lambda} \cdot T \cdot d\lambda} \quad (1)$$

donde $E(\lambda)$ es el espectro de acción del eritema a la longitud de onda λ (C. I. E., 1998). $I(\lambda)$ es la irradiación espectral de la luz solar a la longitud de onda λ (McKinlay y Diffey, 1987). $T = (10^{-A(\lambda)})$ es la transmitancia espectral de la capa de filtro solar a la longitud de onda λ .

$$PF-UVA_{in vitro} = \frac{\int_{320}^{400} P_{\lambda} \cdot I_{\lambda} \cdot d\lambda}{\int_{320}^{400} P_{\lambda} \cdot I_{\lambda} \cdot T \cdot d\lambda} \quad (2)$$

donde $P(\lambda)$ es el espectro de acción del oscurecimiento pigmentario persistente (PPD, de sus siglas en inglés) en longitud de onda λ (Mejía, Henao, Gallardo, Atehortúa, y Puertas, 2016). $I(\lambda)$ es la irradiación espectral de la luz solar en longitud de onda λ (McKinlay y Diffey, 1987). $T = (10^{-A(\lambda)})$ es la transmitancia espectral de la protección solar para a la longitud de onda λ .

La longitud de onda crítica (λ_c) se calculó con la Ecuación No. 3 (Hojerová *et al.*, 2011; Velasco *et al.*, 2008):

$$\int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda) d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda) d\lambda \quad (3)$$

donde A es la absorbancia, λ_c la longitud de onda crítica (nm) y λ la longitud de onda (nm).

El radio UVA/UVB se calculó usando la Ecuación No. 4 (Velasco *et al.*, 2008):

$$\text{UVA/UVB} = \frac{\int_{320}^{400} A(\lambda) d\lambda / \int_{320}^{400} d\lambda}{\int_{290}^{320} A(\lambda) d\lambda / \int_{290}^{320} d\lambda} \quad (4)$$

donde A es la absorción y λ es la longitud de onda [nm].

Por último, el índice SPF se usó para expresar la fotoestabilidad (F_e) de los extractos o compuestos estudiados y expresado en porcentaje (%) de fotoprotección remanente según la ecuación No. 5 (Mejía *et al.*, 2016).

$$F_e (\%) = \frac{SPF \text{ Irradiado}}{SPF \text{ Sin Irradiar}} * (100) \quad (5)$$

El cálculo de todos los índices descritos anteriormente se llevó a cabo usando una plantilla Excel u hoja de cálculo desarrollada a tales fines. Adicionalmente, se estudió la correlación entre los diferentes métodos o índices aquí calculados con otros índices de protección del daño genético usando la plataforma R y un “script” desarrollado a tales fines (Fuentes *et al.*, 2017; R Core Team, 2013).

4 Resultados

El índice $SPF_{in \text{ vitro}}$ (eficacia de protección frente a UVB), indicó que 36 (76.6%) de los 47 extractos evaluados presentan algún grado de fotoprotección. De acuerdo con la escala de fotoprotección establecida para este índice los resultados son los siguientes: muy alta (16 extractos), alta (5 extractos), media (8 extractos) y baja (7 extractos) (European Commission, 2006b). Considerando como promisorios solo aquellos extractos en los niveles alto y muy alto, el 44.7 % de los extractos podrían ser considerados extractos que contienen moléculas que absorben luz UV en el rango espectral UVB; por tanto, potenciales fuentes de compuestos fotoprotectores. Estos son: *A. satureioides* COL579420, *A. peruviana* COL579246, *C. moritzianus* COL578360, *C. pellia* COL 559437, *E. pendula* COL560238, *H. brachiata* COL582531-F1, *H. sinuata* COL578965-F2, *L. organoides* COL560259, *L. organoides* COL560260, *M. septentrionalis* COL560244, *P. caerulea* COL 560247, *P. cumanense* COL 578977, *P. dilatatifolium*

COL578975, *P. eriopodon* COL578364, *P. eriopodon* COL 578974-F2, *P. subflavum* COL 578976, *P. subflavum* COL 582361-F2, *S. aratocensis* COL560246, *T. caracasana* COL559441, *T. diffusa* COL560255 y *T. diffusa* COL 578361-F2 (Ver apéndice A).

El índice PF-UVA_{in vitro} (eficacia de protección frente a UVA), indicó que en solo 6 (12.8%) de los 47 extractos evaluados, se cumple el criterio de fotoprotección (PF-UVA_{in vitro} \geq 1/3 SPF_{in vitro}). Estos son: *B. aestuans* COL560990, *H. brachiata* COL582531-F2, *Hyptis suaveolens* COL578964-F1, *L. origanoides* COL 582599-F2, *S. aggregate* COL560249, *W. calycina* COL559439.

Según estos resultados, estos extractos podrían contener moléculas que absorben luz UV en el rango espectral UVA. Sin embargo, vale aclarar que ninguno de estos extractos resultaron promisorios según lo indicado por el índice SPF_{in vitro}; por lo que ninguno de estos fueron considerados promisorios. Estos resultados están en correspondencia con el hecho de que los índices SPF_{in vitro} y PF-UVA_{in vitro} estiman la eficacia fotoprotectora basados en la capacidad de absorción en zonas espectrales diferentes de luz UV.

Por su parte, el índice λ_c indicó que 46 (98%) de los 47 extractos evaluados presentan algún grado de fotoprotección. De acuerdo a la escala de fotoprotección establecida para este índice, los resultados son los siguientes: ★★★★★ (6 extractos), ★★★ (29 extractos), ★★ (9 extractos), ★ (2 extractos) y cero (1 extracto). Considerando como promisorios aquellos extractos en los niveles más altos (★★★★ y ★★★), el 76.6 % de los extractos podrían ser considerados extractos que contienen moléculas que absorben luz UV; por tanto, potenciales fuentes de compuestos fotoprotectores. Estos son: *A. popayanensis* COL579422, *A. peruviana* COL579246, *B. nítida* COL559436, *B. aestuans* COL560990, *C. moritzianus* COL578360, *Calycolpus ssp.* COL560976, *C. pellia* COL559437, *E. pendula* COL560238, *E. puniceifolia* COL560250, *H. brachiata*

COL582531-F1, *H. sinuata* COL578965-F1, *H. sinuata* COL578965-F2, *L. canescens* COL578969, *L. micromera* COL578971, *L. origanoides* COL560259, *L. origanoides* COL560260, *L. origanoides* COL560980, *L. origanoides* COL582599-F1, *M. septentrionalis* COL560244, *P. caerulea* COL560247, *P. cumanense* COL578977, *P. dilatatifolium* COL578975, *P. eriopodon* COL578364, *P. eriopodon* COL578974-F2, *P. subflavum* COL578976, *P. subflavum* COL582361-F2, *P. amboinicus* COL560245, *P. sartorianum* COL578359, *S. aratocensis* COL560246, *S. aggregate* COL560249, *S. crotonifolium* COL560253, *T. caracasana* COL559441, *T. diffusa* COL560255, *T. diffusa* COL578361-F1 y *T. diffusa* COL578361-F2. Según estos resultados, estos extractos podrían contener moléculas que absorben luz UV en el rango espectral UVB-UVA.

Según la FDA (2011), se considera un fotoprotector de "Amplio espectro" si $SPF_{in vitro} \geq 15$ y $\lambda_c \geq 370$ nm (US FDA, 2011b). Aquí nosotros consideramos un extracto como promisorios si su $SPF_{in vitro} \geq 30$. Por tanto, y considerando la norma FDA, los extractos que podrían ser considerados de amplio espectro son los siguientes: *C. moritzianus* COL578360, *H. sinuata* COL578965-F2, *P. eriopodon* COL578974-F2 y *S. aratocensis* COL560246.

Por último, el índice R indicó que los 47 (100%) extractos evaluados presentan algún grado de fotoprotección. De acuerdo a la escala de fotoprotección establecida para este índice, los resultados son los siguientes: ★★☆☆ (1 extractos), ★★★ (2 extractos), ★★ (36 extractos), ★ (8 extractos). Considerando como promisorios aquellos extractos en los niveles más altos (★★★★ y ★★★), solo 3 (12.8%) de los extractos podrían ser considerados extractos que contienen moléculas que absorben luz UV; por tanto, potenciales fuentes de compuestos fotoprotectores. Estos son: *Calycolpus ssp.* COL560976, *E. puniceifolia* COL560250 y *H. brachiata* COL582531-F1.

El índice de fotoestabilidad (F_e) frente a la UVB fue calculado para cada extracto evaluado. En general, los extractos mostraron alta estabilidad frente a la radiación UVB. Considerando como criterio de estabilidad un valor de $F_e \geq 70\%$, 36 extractos (76.6 %) fueron estables frente a la UVB y 11 extractos (23.4%) no lo fueron.

De los resultados se puede constatar, que usando los índices *in vitro* actualmente descritos para el cálculo de la eficacia fotoprotectora ($SPF_{in vitro}$, $PF-UVA_{in vitro}$, λ_c y R), no se observa una clara coincidencia en estos estimados en la muestra de extractos estudiados (Ver apéndice A). Con el fin de precisar el grado de concordancia entre estos índices, se desarrollaron correlaciones entre los estimados de su eficacia fotoprotectora (Ver apéndice B).

Como se puede constatar, hubo correlaciones en diferente grado para diferentes combinaciones de índices estudiados como sigue. El índice $SPF_{in vitro}$ mostró correlación positiva alta y moderada con los índices $PF-UVA_{in vitro}$ ($CC = 0.85$, $p < 0.01$) y λ_c ($CC = 0.39$, $p < 0.01$), respectivamente. Por el contrario, este índice correlacionó negativamente con el índice R ($CC = -0.12$, $p < 0.01$). Adicionalmente, el índice $PF-UVA_{in vitro}$ mostró correlación positiva con el índice λ_c ($CC = 0.62$, $p < 0.01$), pero no correlacionó con el índice R (0.14 , $p = 0.34$, n.s). Por último, los índices λ_c y R mostraron una correlación positiva ($CC = 0.52$, $p < 0.01$). En resumen, los índices $SPF_{in vitro}$, $PF-UVA_{in vitro}$ y λ_c estuvieron correlacionados entre sí; siendo el λ_c quien mostró correlación positiva con todos los índices.

Considerando que el índice λ_c se refiere al 90% del área bajo la curva de extinción para la zona espectral UVB-UVA (290-400nm) alcanzada para una muestra dada, nosotros agrupamos los extractos estudiados según su patrón de absorbancia UV en 4 tipos generales (Ver apéndice C). Dichos patrones de absorbancia UV mostraron coeficientes de correlación con los índices de eficacia fotoprotectora como sigue: $SPF_{in vitro}$ ($CC = 0.57$, $p < 0.01$), $PF-UVA_{in vitro}$ ($CC = 0.54$, p

< 0.01), λ_c ($CC = 0.48$, $p < 0.01$) y R ($CC = 0.06$, $p = 0.67$ n.s.). Esto nos indica que el patrón de absorbancia UV de los extractos es determinante en el nivel de asociación mostrado entre los índices $SPF_{in vitro}$, $PF-UVA_{in vitro}$ y λ_c .

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se evidenció la utilidad de los estimados de fotoprotección basado en índices del daño genético como el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) (Fuentes *et al.*, 2017). Usando una matriz de datos del %IG de cada extracto estudiado, se desarrollaron correlaciones con los índices de eficacia fotoprotectora ($SPF_{in vitro}$, $PF-UVA_{in vitro}$, λ_c y R) con el fin de evaluar la correspondencia entre eficacia fotoprotectora y reducción de daño genético.

Dichas análisis mostraron coeficientes de correlación con los estimados de eficacia fotoprotectora como sigue: $SPF_{in vitro}$ ($CC = 0.37$, $p < 0.01$), $PF-UVA_{in vitro}$ ($CC = 0.35$, $p < 0.01$), λ_c ($CC = 0.17$, $p = 0.24$ n.s.) y R ($CC = 0.01$, $p = 0.91$ n.s.). Por tanto, solo los índices $SPF_{in vitro}$ y $PF-UVA_{in vitro}$ mostraron correlación positiva con el índice basado en daños genético (%IG). Es decir, a mayor eficacia fotoprotectora, menor daño genético. Los restantes índices (λ_c y R) no mostraron correlación.

Con respecto al potencial fotoprotector de los compuestos estudiados basado en los diferentes índices de fotoprotección (Ver apéndice D). El índice $SPF_{in vitro}$, indicó que 2 (20%) de los 10 compuestos puros evaluados presentaron algún grado (bajo) de fotoprotección comparado con el protector solar usado como control. Estos son: Apigenina y β -cariofileno. Por el contrario, el índice $PF-UVA_{in vitro}$, mostró que 7 (70%) de los 10 compuestos puros evaluados presentan fotoprotección. Estos son: Pinocembrina, Naringenina, Apigenina, Quercitina, Curcumina, β -cariofileno y ρ -cimeno. Por su parte, el índice λ_c indicó que 4 (40%) de los 10 compuestos puros evaluados presentan alto grado de fotoprotección. Estos son: Apigenina, Quercitina, Curcumina y

β -cariofileno. Así mismo, el índice R indicó que los 5 (50%) de los 10 compuestos puros evaluados presentan diferente grado de fotoprotección. Estos son: Naringenina, Apigenina, Quercitina, β -carifileno y ρ -cimeno. Los restantes compuestos no fueron protectores de acuerdo a estos índices.

Por último, el índice de fotoestabilidad (F_e) frente a la UVB fue calculado para cada compuesto puro. En general, los compuestos puros mostraron alta estabilidad frente a la radiación UVB. Considerando como criterio de estabilidad un valor de $F_e \geq 70\%$, 7 componentes puros (70 %) fueron estables frente a la UVB y 3 componentes puros (30%) no lo fueron.

5 Discusión

En el presente estudio se demostró el potencial de las plantas de la flora colombiana como fuentes de compuestos fotoprotectores. De acuerdo a los resultados obtenidos, se constató que nuestra flora tiene potencial como fuente de compuestos para el desarrollo de fotoprotectores solares. Un porcentaje importante (44.7 %) de las plantas estudiadas mostraron alto nivel de protección frente a la radiación UVB. Sin embargo, solo cuatro de estas plantas mostraron además potencial fotoprotector frente a la radiación UVA basado en su índice λ_c . Estas fueron: *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae), *Hyptis sinuata* (Lamiaceae), *Piper eripodon* (Piperaceae) y *Salvia aratocensis* (Lamiaceae); indicando su potencial para el desarrollo de fórmulas con un amplio espectro de fotoprotección. Estos resultados son soportados por los datos de eficacia fotoprotectora de los compuestos puros; en especial, aquellas combinaciones de compuestos que puede proteger

en diferentes zonas del espectro UV. Por ejemplo, apigenina + β -cariofileno, entre otras combinaciones.

En un estudio previo (Mejía et al., 2016), se evaluó el potencial fotoprotector de algunas especies de plantas colombianas de la familia Asteraceae. Estos autores, encontraron que dos especies de plantas (*Baccharis antioquiensis*, *Pentacalia pulchella*) presentaron un amplio espectro de fotoprotección. Otro estudio de especies de planta de Polonia mostro que las especies (*Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna* y *Sambucus nigra*) presentan polifenoles con amplio espectro de fotoprotección (Jarzycka et al., 2013). Por último, un estudio desarrollo con las especies de plantas brasileñas *Passiflora incarnata* y *Plantago lanceolata*, mostró que el extracto de *P. incarnata* aumentó la capacidad fotoprotectora de amplio espectro de un protector solar asociado con otros filtros UV (Velasco et al., 2008). Estos hallazgos, colocan a la flora colombiana como una de las más promisorias en la búsqueda de compuestos con utilidad para el desarrollo de bloqueadores solares.

Este estudio además mostró que los índices $SPF_{in-vitro}$ y el λ_c fueron los más informativos para evaluar la eficacia fotoprotectora de extractos de plantas. Estos índices han sido validados en estudios previos, comparando su eficacia fotoprotectora con índices basados en la medición *in vivo* del eritema en piel expuesta a UV como el $SPF_{in vivo}$ (Couteau, Pommier, Papis, y Coiffard, 2007). Adicionalmente, el uso de estos índices *in vitro* no está sujeto a temas éticos, permitiendo el escrutinio seguro de un amplio número de muestras (Stanfield, Osterwalder y Herzog, 2010). En tal sentido, nuestros datos aportan nueva evidencia sobre la utilidad de tales índices en el estudio de la eficacia fotoprotectora de las plantas.

Por último, en nuestro estudio se evidenció el grado de asociación entre diferentes índices *in vitro*; mostrando que solo algunos de ellos muestran correlaciones altas y positivas. Esto nos

permite establecer criterios más realistas sobre que índices usar para la evaluación de la eficacia fotoprotectora. La incongruencia de los índices *in vitro*, es un tema ampliamente discutido en la literatura. Para superar sus limitaciones, se ha propuesto el uso de índices basados en dosímetros de ADN como un complemento para mejorar el actual sistema que mide la eficacia fotoprotectora de bloqueadores solares (Schuch, Lago, Yagura y Menck, 2012). En el presente estudio se evidenció que el índice %IG, el cual mide la capacidad de la muestra de ADN para proteger al ADN, presenta correlaciones moderadas positivas con los índices $SPF_{in-vitro}$ y $PF-UVA_{in vitro}$. Esto indica que al menos parcialmente la eficacia fotoprotectora está relacionada con menor daño genético; pero se requerirá estudios adicionales para precisar este tipo de relación.

6 Conclusiones

La flora colombiana tiene potencial como fuente de compuestos para el desarrollo de bloqueadores solares. En su amplia mayoría estas plantas mostraron alta protección frente a UVB; y solo en unos pocos casos frente a UVA. En tal sentido, solo extractos de plantas presentan compuestos con amplio espectro de fotoprotección. Estas son: *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae), *Hyptis sinuata* (Labiatae), *Piper eriopodon* (Piperaceae) y *Salvia aratocensis* (Labiatae).

Los índices $SPF_{in-vitro}$ y el λ_c fueron los más informativos para medir la eficacia fotoprotectora de los extractos de plantas estudiados.

Los índices $SPF_{in-vitro}$ y $PF-UVA_{in vitro}$ mostraron correlaciones moderadas positivas con el índice daño genético (%IG); indicando la necesidad de usar estos índices de manera complementaria durante la medición de la eficacia fotoprotectora. Esto además indica la necesidad de mejorar el actual sistema que mide la eficacia fotoprotectora de bloqueadores solares.

Bibliografía

Colipa 2011. Cosmetics Europe: the Personal Care Association. In vitro Method for the Determination of the UVA Protection Factor and "Critical Wavelength" Values of Sunscreen Products. Guideline prepared by the COLIPA In vitro UV Protection Method Task Force. URL: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europeassociation/guidelines.html?view=item&id=33%3Amethod-for-in-vitro-determination-of-uvaprotection-2011&catid=46%3Aguidelines> [Accessed 2017-05-15].

COLIPA, 2007. Colipa Guidelines: Method for the In Vitro Determination of UVA Protection Provided by Sunscreen Products. COLIPA.

Couteau, C., Pommier, M., Paparis, E., & Coiffard, L. J. (2007). Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested in vitro. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(6), 449-452.

Diffey, B. (1994). A method for broad spectrum classification of sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*, 16(2), 47-52.

Elmets, C. A., Singh, D., Tubesing, K., Matsui, M., Katiyar, S., & Mukhtar, H. (2001).

Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44(3), 425-432.

European Commission, 2006b. European Commission Recommendation on the efficacy of sunscreen products and the claims relating thereto. 2006/647/EC. OJ L 265, 26.09.2006, pp. 39–43.

Ferrero, L., Pissavini, M., Dehais, A., Marguerie, S., & Zastrow, L. (2007). Importance of substrate roughness for in vitro sun protection assessment. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(1), 59-59.

Fourtanier, A., Moyal, D., & Seité, S. (2008). Sunscreens containing the broad-spectrum UVA absorber, Mexoryl® SX, prevent the cutaneous detrimental effects of UV exposure: a review of clinical study results. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 24(4), 164-174.

Fuentes, J. L., Forero, A. G., Ruiz, N. Q., Medina, C. P., Castellanos, N. R., Niño, D. F., Contreras-García, D. A., Córdoba-Campo, & Stashenko, E. E. (2017). The SOS Chromotest applied for screening plant antigenotoxic agents against ultraviolet radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(9), 1424-1434.

- Godar, D. E. (2011). Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma. *Journal of Skin Cancer*, 2011, 2011: 858425
- Herzog, B., Mongiat, S., Deshayes, C., Neuhaus, M., Sommer, K., & Mantler, A. (2002). In vivo and in vitro assessment of UVA protection by sunscreen formulations containing either butyl methoxy dibenzoyl methane, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol, or microfine ZnO. *International Journal of Cosmetic Science*, 24(3), 170-185
- Hojerová, J., Medovčíková, A., & Mikula, M. (2011). Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. *International journal of pharmaceutics*, 408(1-2), 27-38.
- Ikehata, H., & Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research*, 52(2), 115-125.
- Jarzycka, A., Lewińska, A., Gancarz, R., & Wilk, K. A. (2013). Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 128, 50-57.
- Karol, M. H. (2009). How environmental agents influence the aging process. *Biomolecules & Therapeutics*, 17(2), 113-124.

- Kluschke, F., Weigmann, H. J., Schanzer, S., Meinke, M., Vergou, T., Sterry, W., & Lademann, J. (2014). Gain or loss? Sunscreen efficiency after cosmetic pretreatment of the skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(2), 82-89.
- Kuchel, J. M., Barnetson, R. S. C., Zhuang, L., Strickland, F. M., Pelley, R. P., & Halliday, G. M. (2005). Tamarind inhibits solar-simulated ultraviolet radiation-induced suppression of recall responses in humans. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2(2), 165-171.
- Lee, E. H., Faulhaber, D., Hanson, K. M., Ding, W., Peters, S., Kodali, S., & Granstein, R. D. (2004). Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(2), 510-517.
- Leiter, U., & Garbe, C. (2008). Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. In *Sunlight, vitamin D and skin cancer* (pp. 89-103). Springer, New York, NY.
- López-Camarillo, C., Aréchaga Ocampo, E., López Casamichana, M., Pérez-Plasencia, C., Álvarez-Sánchez, E., & Marchat, L. A. (2011). Protein kinases and transcription factors activation in response to UV-radiation of skin: implications for carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 142-172.

- Matsui, M. S., Hsia, A., Miller, J. D., Hanneman, K., Scull, H., Cooper, K. D., & Baron, E. (2009, August). Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14(1), 56-59.
- Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3), 298-308.
- McKinlay, A.F. and Diffey, B.L. (1987) A Reference Action Spectrum for Ultraviolet Induced Erythema in Human Skin. *CIE Journal*, 6, 17-22.
- Mejía-Giraldo, J. C., Henao-Zuluaga, K., Gallardo, C., Atehortúa, L., & Puertas-Mejía, M. A. (2016). Novel In Vitro Antioxidant and Photoprotection Capacity of Plants from High Altitude Ecosystems of Colombia. *Photochemistry and photobiology*, 92(1), 150-157.
- Moore, J. O., Wang, Y., Stebbins, W. G., Gao, D., Zhou, X., Phelps, R., & Wei, H. (2006). Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27(8), 1627-1635.
- Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and Photobiology*, 65(2), 270-283.

- Pfeifer, G. P., & Besaratinia, A. (2012). UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *11*(1), 90-97.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org>.
- Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens. *Photochemistry and Photobiology*, *29*(3), 559-566.
- Schuch, A. P., Lago, J. C., Yagura, T., & Menck, C. F. M. (2012). DNA dosimetry assessment for sunscreen genotoxic photoprotection. *PloS one*, *7*(6), e40344.
- Stahl, W., & Sies, H. (2007). Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Molecular Biotechnology*, *37*(1), 26-30.
- Standard, C. I. E. (1998). Erythema reference action spectrum and standard erythema dose. *CIE S*, *7*, E1998.
- Stanfield, J., Osterwalder, U., & Herzog, B. (2010). In vitro measurements of sunscreen protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *9*(4), 489-494.

Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cala, M. P., Durán, D. C., & Caballero, D. (2013).

Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, 36(1), 192-202.

US FDA 2011b. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration.

Labeling and Effectiveness Testing; Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use. 21 CFR Parts 201 and 310 [Docket No. FDA-1978-N-0018] (Formerly Docket No. 1978N0038) RIN 0910-AF43. Final Rule. Federal Register / Vol. 76, No. 117 / Friday, June 17, 2011 / Rules and Regulations 35620-35665. URL: <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=FDA-1978-N-0018-0698> [Accessed 2017-07- 15].

Velasco, M. V. R., Sarruf, F. D., Salgado-Santos, I. M. N., Haroutiounian-Filho, C. A., Kaneko,

T. M., & Baby, A. R. (2008). Broad spectrum bioactive sunscreens. *International journal of pharmaceutics*, 363(1-2), 50-57.

Vink, A. A., & Roza, L. (2001). Biological consequences of cyclobutane pyrimidine

dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 65(2-3), 101-104.

Wang, S. Q., Stanfield, J. W., & Osterwalder, U. (2008). In vitro assessments of UVA protection

by popular sunscreens available in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(6), 934-942.

Wikonkal, N. M., & Brash, D. E. (1999, September). Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 4(1), 6-10.

Zaidi, M. R., Day, C. P., & Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2381-2391.

Lista De Apéndice

(Ver apéndices adjuntos en el CD y pueden visualizarlos en la Base de datos de la Biblioteca UIS)

Apéndice A. Valores de diferentes índices de fotoprotección para los extractos estudiados. Se presenta además, los valores del coeficiente de eficiencia ($F_e\%$) fotoprotectora y los patrones o perfiles de absorbancia UV (P_{ab}) de cada extracto.

Apéndice B. Valores del coeficiente de correlación (CC) Producto-Momento (Pearson) entre los diferentes índices de eficacia fotoprotectora. Entre paréntesis se presentan los valores de significación de la prueba. Se presentan además las correlaciones entre dichos índices con el patrón de absorbancia UV (P_{ab}) y el %IG de los extractos.

Apéndice C. Diferentes tipos de patrones de absorbancia presentados por la muestra de extractos estudiados. A: Tipo I, B: Tipo II, C: Tipo III y D: Tipo IV.

Apéndice D. Valores de diferentes índices de fotoprotección para los diferentes componentes puros. Se presenta además, el coeficiente de eficiencia (%) obtenido para cada componente puro.

