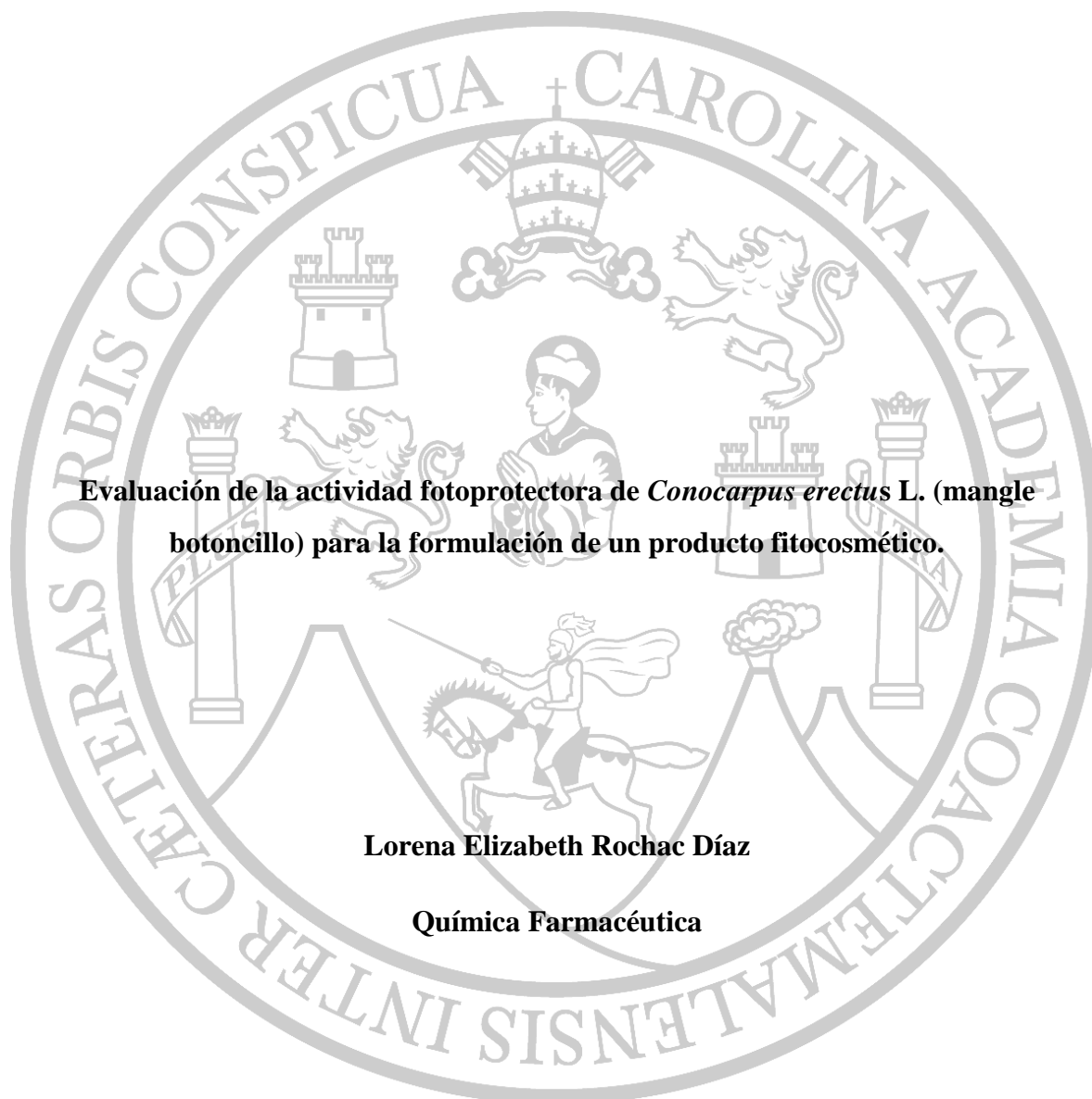


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



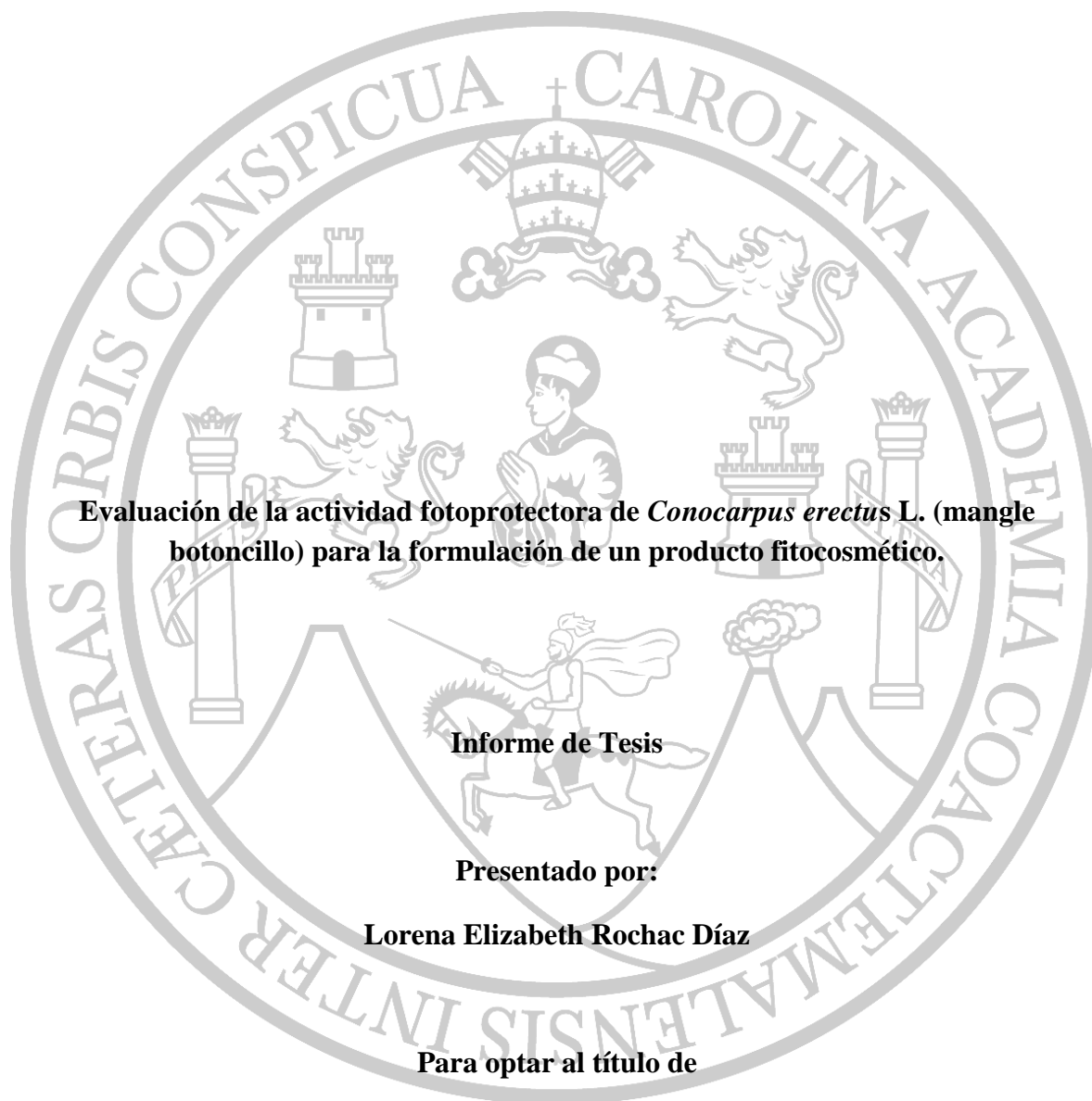
**Evaluación de la actividad fotoprotectora de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) para la formulación de un producto fitocosmético.**

**Lorena Elizabeth Rochac Díaz**

**Química Farmacéutica**

**Guatemala, marzo de 2020**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**Evaluación de la actividad fotoprotectora de *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) para la formulación de un producto fitocosmético.**

**Informe de Tesis**

**Presentado por:**

**Lorena Elizabeth Rochac Díaz**

**Para optar al título de**

**Química Farmacéutica**

**Guatemala, marzo de 2020**

## **Junta Directiva**

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovanni Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merarí Caceros Castañeda	Vocal V

## **Agradecimientos**

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser mi Alma Mater y por brindarme la mejor educación de nivel superior.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y a los docentes que me brindaron los conocimientos y herramientas para desarrollarme como profesional.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –Lipronat-, por abrirme sus puertas como pasante y luego como auxiliar, al dejarme usar sus instalaciones, equipos y reactivos para la realización de mi trabajo de investigación y por brindarme algunos de los mejores momentos como estudiante.

A mi asesora, Dra. Sully Margot Cruz Velásquez, por guiarme por el camino para ser una buena profesional durante estos dos años. Por ayudarme a elegir tema de investigación y por su asesoramiento en la realización del mismo.

A mi revisora, M.Sc. Nereida Marroquín Tintí, por su amistad, por su apoyo, paciencia y palabras de aliento en la realización de mi trabajo de investigación y por ser un modelo a seguir al ser una excelente profesional.

A mis compañeras del Lipronat, por sus palabras de aliento, por las risas y por su apoyo en el laboratorio y en la realización de la parte experimental de mi tesis.

## **Dedicatoria**

A mi mamá, Eugenia Díaz Cordero, por ser un ejemplo de fortaleza y perseverancia. Gracias por guiarme a lo largo de mi vida, por tu paciencia y confianza y por los sacrificios que hiciste para que a mis hermanas y a mí nunca nos faltara nada, a ti te debo este logro.

A mis hermanas, Francis y Claudia Quintana, por los momentos de risas y enojos, que fortalecen nuestros lazos de hermanas. Gracias por ser grandes ejemplos a seguir, motivarme siempre a seguir adelante y por cuidar de mí.

A mi abuelita, María Eugenia Medina, que en paz descansa, por haberme cuidado desde pequeña y siempre motivarme a estudiar y ser mejor. Sé que siempre me cuidará desde el cielo.

A mi papá, Carlos Rochac, por apoyarme a lo largo de mi carrera, por sus llamadas, anécdotas, consejos y palabras de aliento.

A Aaron Alberto y Fanny Lu, por ser mi alegría durante toda la carrera y acompañarme en las noches de desvelos, siempre estarán en mi corazón.

A mi sobrino, Andrés Jiménez, por ser la alegría de la casa, por poner en práctica mi paciencia y por todo su cariño.

A mis amigos, Gaby, Mónica, Mayrita y Ernesto, por su amistad, apoyo y cariño, la universidad no hubiera sido igual sin amistades sinceras como ustedes que hicieron que los días estresantes fueran divertidos, saben que siempre cuentan conmigo.

A Ana, Libny, Mónica, Nere, Nancy, Silvia y Oscar, por sus palabras, por la paciencia, por el apoyo brindado y por hacer que los días de trabajo sean alegres y divertidos, espero poder seguir contando con su amistad y compañerismo.

## Índice

1.	Resumen .....	1
2.	Introducción .....	2
3.	Antecedentes .....	3
4.	Justificación.....	18
5.	Objetivos .....	19
6.	Hipótesis.....	20
7.	Materiales y Métodos .....	21
8.	Resultados .....	40
10.	Conclusiones.....	56
11.	Recomendaciones.....	57
12.	Referencias Bibliográficas .....	58
13.	Anexos .....	62

## 1. Resumen

Los compuestos fenólicos se han relacionado con la actividad antioxidante de las plantas y esta actividad se ha visto relacionada con la actividad fotoprotectora. *Conocarpus erectus* L., conocido comúnmente como mangle botoncillo, ha demostrado tener una alta concentración de flavonoides y taninos en el material vegetal. En este estudio, se cuantificó la cantidad de flavonoides y taninos en los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo, también se evaluó su actividad antioxidante por cromatografía en capa fina de DPPH y se cuantificó por medio del método de ABTS, posteriormente se determinó el factor de protección solar.

El extracto etanólico de corteza fue el que presentó la mayor concentración de flavonoides y taninos, siendo estos de 6.59% y 23.98% respectivamente. Todos los extractos presentaron una buena actividad antioxidante por CCF, siendo la corteza el que presentó la mejor  $CI_{50}$  de 0.2152 mg/mL y el mejor FPS de 6.75 a una concentración de 0.01%, la hoja y la raíz presentaron un FPS de 7.03 y 5.01 a una concentración de 0.015% y 0.0125% respectivamente. Asimismo, se elaboró un producto fitocosmético a partir de cada extracto y en combinación con un protector solar orgánico, determinándose su contenido de taninos, su actividad antioxidante por cromatografía en capa fina y el factor de protección solar.

La concentración de taninos fue de 5.44-6.85% para las seis cremas formuladas, todas las cremas presentaron una actividad antioxidante moderada y un FPS entre 1.51-7.06 para las cremas formuladas únicamente con el extracto y un FPS entre 32.14-33.57 para las formuladas con el extracto y la benzofenona-4. Esto permitió determinar que las cremas formuladas únicamente con los extractos de mangle botoncillo no poseen actividad fotoprotectora al tener un FPS bajo, pero el uso de los extractos con un protector solar orgánico permite obtener un FPS óptimo, disminuyendo de esta manera la necesidad de agregar más de un agente orgánico y evitando las reacciones adversas asociadas a estos.

## 2. Introducción

La exposición a la radiación solar puede producir, en el ser humano, efectos agudos como quemaduras solares y el bronceado, y crónicos en la salud de la piel, los ojos y el sistema inmunitario debido a la degeneración de las células, del tejido fibroso y de los vasos sanguíneos ocasionando cáncer de piel y cataratas.. Actualmente se ha detectado en todo el mundo un pronunciado incremento de la incidencia de cáncer de piel vinculado a la exposición al sol y a los rayos ultravioleta (Organización Mundial de la Salud, 2003).

Para prevenir dichos problemas se ha aumentado el uso de fotoprotectores, los cuales son agentes que tienen la finalidad de proteger la estructura y preservar la función de la piel contra el daño actínico (Vitale, 2002). Actualmente, se han utilizado productos naturales como fotoprotectores o en combinación con fotoprotectores sintéticos para aumentar el factor de protección, debido a la presencia de antioxidantes.

Guatemala cuenta con cuatro especies de mangle de la clasificación del Sistema de humedal Estuarino: *Rhizophora mangle* L., *Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaerth, *Avicennia germinans* (L.) L. y *Conocarpus erectus* L. (Instituto Nacional de Bosques [INAB], 2011); siendo el más estudiado *Rhizophora mangle* L. por su actividad cicatrizante, antibacteriana y anticancerígena. Sin embargo, el mangle botoncillo (*Conocarpus erectus* L.) ha demostrado la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides, metabolitos que le confieren actividad antioxidante, propiedad que está relacionada con el efecto fotoprotector al inhibir los radicales libres.

Este estudio determinó la actividad fotoprotectora de *Conocarpus erectus* L. mediante la cuantificación de flavonoides y taninos que poseen actividad antioxidante y la evaluación del factor de protección solar, para la formulación de un producto fitocosmético, comparándolo con las investigaciones realizadas sobre la actividad fotoprotectora de otras plantas, para buscar una alternativa natural en la formulación de protectores solares.



### 3. Antecedentes

#### 3.1 Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta forma parte del espectro electromagnético, abarcando una longitud de onda entre los 200 nm a 400 nm (Magliano, 2011). El espectro ultravioleta, a su vez, se divide de acuerdo a la longitud de onda en radiación ultravioleta C (UVC), radiación ultravioleta B (UVB) y radiación ultravioleta A (UVA), conocidas como gemicida, eritematógena y negra, respectivamente (Moreno, y Moreno, 2010). La radiación ultravioleta que alcanza la superficie de la Tierra es más de un 95% de UVA y un 5% de UVB; sin embargo, la luz UVB es la responsable de mayor parte de los daños biológicos ocasionados por la luz solar (González, Vernhes, y Sánchez, 2009).

##### 3.1.1 Radiación ultravioleta C (100 nm a 280 nm)

Las radiaciones UV de mayor energía son las de tipo C (González *et al.*, 2009). La radiación UVC es la más dañina, pero es absorbida por las moléculas de oxígeno y la capa de ozono de la atmósfera, especialmente las radiaciones menores de 285 nm (Moreno, y Moreno, 2010). Sin embargo, este tipo de radiación es emitida por fuentes artificiales tales como lámparas germicidas y lámparas de arco de mercurio.

##### 3.1.2 Radiación ultravioleta B (280 nm a 315 nm)

La radiación UVB es la que induce el eritema, el cual alcanza picos en 6 y 12 horas posteriores a la exposición solar (Moreno y Moreno, 2010); puede causar quemaduras solares. Es el que induce la formación de productos pirimidínicos, la isomerización de *trans-* a *cis-* del ácido urónico, la actividad de la descarboxilación de la ornitina, la estimulación de la síntesis de ADN, el fotoenvejecimiento, relacionado con la formación de cáncer de piel tipo carcinomas basocelulares y espinocelulares al causar mutaciones en los oncogenes y genes supresores de tumores, y con la formación de

inmunosupresión sistémica. Los cromóforos celulares para la radiación UVB son los ácidos nucleicos, aminoácidos como triptófano y tirosina, quinonas, flavonoides, forfirinas y ácido urónico (Saewan & Jimtaisong, 2013).

### **3.1.3 Radiación ultravioleta A (315 nm a 400 nm)**

La radiación UVA es la que produce el oscurecimiento de la piel; penetra a fondo la epidermis y la dermis, alrededor de 1 mm (Saewan & Jimtaisong, 2013); con dosis altas produce eritema de forma inmediata; promueve la generación de especies reactivas de oxígeno; suprime la función inmune y es el implicado en el fotoenvejecimiento prematuro de la piel por la exposición prolongada debido a que causa daño en las estructuras subyacentes de la dermis (Rai & Srinivas, 2007).

Actualmente se sabe que la UVA actúa de manera bifásica; en las primeras dos horas de exposición se da un oscurecimiento pigmentario inmediato, debido a la oxidación de la melanina existente; posteriormente, la prolongación persistente por 72 horas del oscurecimiento pigmentario es causado por un aumento en la actividad de la tirosinasa y la formación de nueva melanina, lo que aumenta el número de melanocitos. La radiación UV causa daño del ADN por estrés oxidativo; el oxígeno reactivo interacciona con fotosensibilizantes endógenos y causa daño indirecto al ADN, las proteínas y las membranas, lo cual aumenta la síntesis de melanina y produce daño directo en las células del tejido conjuntivo dérmico. Hay aumento de la actividad mitótica, que persiste por semanas (Moreno, y Moreno, 2010). El único cromóforo celular capaz de absorber la radiación UVA es el ácido *trans*-urónico (Saewan & Jimtaisong, 2013).

### 3.2 Efectos de la radiación ultravioleta en la piel

Los cromóforos celulares absorben la radiación ultravioleta y transforman la energía en una señal bioquímica; las reacciones bioquímicas que se dan inducen respuestas biológicas resultando en efectos nocivos en la piel (Saewan & Jimtaisong, 2013).

Los efectos nocivos en la piel por la radiación ultravioleta se pueden dividir en agudos, que incluyen las quemaduras solares, eritema, reacciones fototóxicas, fotoalergia y fotosensibilidad; y crónicos como el fotoenvejecimiento, cáncer de piel e inmunosupresión (Saewan & Jimtaisong, 2013).

La mayoría de efectos nocivos en la piel se debe a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como el radical hidroxilo, el anión superóxido y el radical peróxido y sus precursores activos conocidos como oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y ozono; y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) como el óxido nítrico y dióxido nítrico (Saewan & Jimtaisong, 2013).

Los componentes moleculares del ADN absorben los rayos UVB, estos inducen la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano y 6-4 pirimidina-pirimidona, los cuales causan inmunosupresión y carcinogénesis. La radiación ultravioleta media la isomerización del trans-ácido urónico, el cual induce inmunosupresión. La radiación UVA puede mutar el ADN directamente a través del daño oxidativo inducido por los ROS; debido a que promueven la generación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanisina el cual es considerado un marcador del daño oxidativo del ADN (González, Gilaberte, Philips & Juarranz, 2011).

La radiación UV también induce eritema en la piel, vasodilatación y presión sanguínea elevada, activación de células endoteliales y expresión de marcadores proinflamatorios que causan la formación de leucocitos de las células inmunes infiltradas. La amplificación de la respuesta inmune también se produce debido a la

apoptosis de cuerpos acumulados en la piel causada por la muerte celular inducida por ROS. Un efecto aparentemente contradictorio, es la inducción de la inmunosupresión mediada por los rayos UV y la tolerancia inmunológica. La radiación UV induce una marcada disminución en el número de células epidérmicas de Langerhans (ELC), que causa anergia clonal de linfocitos Th1 (González *et al.*, 2011).

La base molecular de la mayoría de estos efectos está relacionada con la oxidación y la generación local de ROS en la piel. La exposición continua a la radiación UV supera los mecanismos antioxidantes endógenos causando estrés oxidativo local. Los ROS inducen daño oxidativo a través de varios mecanismos: uno es la peroxidación de los ácidos grasos esenciales para el plasma y las membranas nucleares, promoviendo el transporte flip-flop a través de las membranas y contribuyendo a la apoptosis celular; ROS también pueden inducir daño al ADN; y pueden oxidar proteínas, que se correlaciona con el envejecimiento acelerado (González *et al.*, 2011).

### **3.3 Fotoprotección**

La fotoprotección tiene como objetivo prevenir el daño que ocurre en la piel por dichas radiaciones (Magliano, 2011). Las medidas de fotoprotección se resumen bajo el acrónimo “SCHEGS” que significa sunscreens (cremas protectores) con factor de protección solar de 15 o más alto; clotng (ropa) que protejan del sol; hats (sombreros) de ala ancha; eyeglasses (gafas) que bloquean los UVA y UVB; shade (sombra) entre 10 am y 4 pm (Camacho, 2001).

### **3.4 Protectores solares**

Un fotoprotector es un producto destinado a la piel humana cuya formulación contiene ingredientes capaces de interferir con la radiación solar reduciendo sus efectos nocivos (Schalka, 2013). Actualmente, el objetivo principal de los protectores solares es el de disminuir los efectos crónicos, para prevenir la aparición

de carcinomas de piel y disminuir la formación de dímeros de pirimidinas, y además, proteger de la inmunosupresión cutánea desencadenada por la depleción de células de Langerhans (Moreno, y Moreno, 2010).

Estos se dividen entre bloqueadores físicos y absorbentes químicos, conocidos actualmente como agentes inorgánicos y orgánicos respectivamente, por su principio activo (Rai & Srinivas, 2007). También pueden usarse agentes antioxidantes, conocidos como filtros biológicos, que evitan la formación de radicales libres y completan las acciones de los otros filtros, estableciendo sinergias (Cruz, 2012).

### **3.4.1 Agentes inorgánicos**

Reflejan y dispersan la radiación UV y la visible a través de una película de partículas inertes formando una barrera opaca. Depende del tamaño de las partículas la protección que ofrecen contra las radiaciones UV tanto por reflexión y absorción. Son fotoestables, no reaccionan con los protectores solares orgánicos y debido a sus propiedades de dispersión de la luz hay menos variabilidad en el efecto fotoprotector en comparación con los orgánicos. Entre ellos se encuentra el dióxido de titanio y el óxido de zinc (Magliano, 2011); ambos pueden alcanzar a brindar protección contra longitudes de onda de hasta 380 nm (UVA I).

Actualmente, no se describen reacciones de hipersensibilidad a los protectores inorgánicos, pero debido a su carácter opaco y oclusivo suelen ser inaceptables desde el punto de vista cosmético. El mayor índice de refracción lo tiene el dióxido de titanio en comparación con el óxido de zinc, lo que explica la apariencia más blanca y por lo tanto la baja aceptabilidad cosmética. Existen filtros inorgánicos de alta calidad, con fórmulas micronizadas. La disminución del tamaño de las partículas (10-50 nm) se

traduce en menos dispersión de la luz visible y logrando un producto estéticamente más aceptable (Magliano, 2011).

### **3.4.2 Agentes orgánicos**

Actúan absorbiendo la radiación UV, ésta activa electrones pasando de un estado pasivo a un estado excitado. Al volver a la condición estable, se emite energía en forma de calor o radiación fluorescente. Transforman la energía lumínica en energía térmica (Magliano, 2011).

Los que absorben las radiaciones UVB son el ácido paraaminobenzoico (PABA), los cinamatos, los salicilatos y octorileno. Todos ellos bloquean de forma eficaz alrededor del 90% de las radiaciones UVB en su espectro completo y por lo tanto ofrecen protección frente a la quemadura y el eritema inducidos por estas radiaciones. El uso del PABA y sus derivados se ha limitado debido a las reacciones adversas cutáneas frecuentemente producidas (Magliano, 2011).

Los que absorben las radiaciones UVA son las benzofenonas, las antralinas, la avobenzona y el ácido tereftalidenodialcanfor sulfónico. Los que absorben ambas radiaciones (amplio espectro) son el Tinosorb M o Tinosorb S. Son incoloros y cosméticamente aceptables, pero presentan un mayor riesgo de alergias de contacto (Magliano, 2011).

### **3.4.3 Agentes antioxidantes**

Al exponer la piel a la radiación ultravioleta, se producen cambios que, generalmente, son neutralizados por antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa) y antioxidantes no enzimáticos (alfa-tocoferol o vitamina E y ácido ascórbico o vitamina C). Los antioxidantes predominantes en la piel son la vitamina C y la vitamina E. No obstante, la cantidad ingerida en la dieta no es suficiente para

contrarrestar los efectos de la radiación, por lo que se hace necesario utilizarlas de manera constante como parte del cuidado diario de la piel (Moreno, y Moreno, 2010).

### **3.5 Factor de protección solar (FPS)**

Indica cuánto tarda una piel protegida, expuesta a la radiación UVB, en causar cierto grado de eritema, comparado con el tiempo que tarda la piel desprotegida en lograr el mismo efecto (Cruz, 2012).

Los fotoprotectores menores de 12 FPS son parcialmente protectores debido a que disminuyen el grado y molestias de la quemadura solar, pero no evitan otras reacciones como el daño al ADN y proteico, con lo que tampoco se evita la carcinogénesis y fotoenvejecimiento. Actualmente la Food and Drug Administration (FDA) considera óptimo un FPS de 30, el cual bloquea el 96.7% de la energía UV (Camacho, 2001).

### **3.6 Nuevas tendencias en la fotoprotección**

Como se ha mencionado, los protectores solares inorgánicos no son cosméticamente aceptables por la coloración blanca que provocan y los protectores solares orgánicos suelen presentar efectos adversos como hipersensibilidad; se ha comenzado a formular protectores solares con agentes antioxidantes como los flavonoides.

Los flavonoides son una clase de metabolitos secundarios fenólicos con propiedades antioxidantes y quelantes. En las plantas, los efectos protectores de los flavonoides en los sistemas biológicos son debido a su capacidad de transferir electrones a radicales libres, la catálisis de la quelación de los metales, la activación de enzimas antioxidantes, reducir el radical alfa-tocoferol e inhibir oxidasas. Por otra parte, los flavonoides protegen a las plantas de la radiación UV e inhiben los radicales libres generados. Por lo tanto, los flavonoides tienen tres efectos de fotoprotección diferentes incluyendo la absorción UV, propiedades antioxidantes directas e

indirectas y la modulación de varias vías de señalización (Saewan & Jimtaisong, 2013).

### 3.7 Fitocosméticos en la fotoprotección

La fitocosmética ofrece una amplia variedad de cosméticos, tanto filtros solares como productos para después del sol, eficaces para la fotoprotección. Las plantas que se utilizan como filtros solares tienen la capacidad de absorber diferentes radiaciones y, generalmente, se formulan asociadas a otros componentes de síntesis y/o pigmentos minerales, para asegurar la eficacia filtrante del fotoprotector. Como extractos vegetales, en la formulación de estos productos se pueden utilizar áloe, cítricos, romero, ratania, hibiscus, entre otros (López, 2007).

Las hojas de Aloe vera (*A. barbadensis*) son la fuente del gel de aloe vera, ampliamente usado por su acción emoliente y revitalizante, se conoce su efecto rejuvenecedor tisular. El azafrán (*Crocus sativus* L.) usado tradicionalmente para diferentes enfermedades incluyendo tumores, posee dos carotenoides conocidos como crocina y crocetina. La crocetina ha mostrado un efecto protector sobre los efectos adversos de los compuestos hepatocarcinogénicos y la crocetina puede inhibir la síntesis de ácidos nucleicos; lo que permite que el azafrán sea utilizado para la prevención del cáncer de piel. El boldo (*Peumus boldus* Molina) es ampliamente usado en la medicina tradicional, éste posee un alcaloide llamado boldina que es conocido como uno de los antioxidantes naturales más potentes; se ha determinado que la boldina tiene un efecto fotoprotector contra los rayos UVB *in vitro* e *in vivo* en ratones y ha llegado a probarse en humanos contra un protector solar comercial con FPS 5, demostrando tener un efecto fotoprotector levemente menor a la crema comercial (Mishra, Mishra & Chattopadhyay, 2011).

Los productos para después del sol se utilizan para el eritema que no precise tratamiento médico, existe una amplia gama elaborados con extractos vegetales con propiedades hidratantes, emolientes, refrescantes, antiinflamatorias y epitelizantes.



Para aliviar la inflamación de una zona cutánea que presenta un eritema, se puede recurrir a extractos vegetales con propiedades antiinflamatorias, generalmente por la presencia de flavonoides; entre los que destacan áloe vera, *Calendula officinalis*, *Aesculus hippocastanum*, *Malva silvestris*, *Sacumbus nigra* y *Matricaria chamomilla*. La actividad epitelizante o cicatrizante, se puede conseguir con el uso de *Centella asiatica*, *Calendula officinalis*, *Echinacea angustifolia*, *Hypericum perforatum*, *Persea gratissima*, *Prunus africanum*, *Tormentilla erecta* y *Glycyrrhiza glabra*, entre otros. Como refrescantes y, por tanto, calmantes del escozor se suelen utilizar plantas como *Matricaria chamomilla*, *Althaea officinalis*, *Tilia cordata* (López, 2007).

En la formulación de estos preparados, también se utilizan frecuentemente los aceites de sésamo, aguacate, jojoba y almendras dulces. Estos aceites vegetales, además de ser emolientes y lubricantes, ejercen acción estimulante y regeneradora tisular (López, 2007).

### **3.8 Manglares**

Los manglares son ecosistemas de pantano, dominados por árboles leñosos llamados mangles que se ubican en litorales tropicales de suelo plano y fangoso, y aguas tranquilas (Mejía, Molina, Sanjuan, Grijalba y Niño, 2014). Los manglares son una transición entre los ecosistemas terrestres y los marinos. Existe una conectividad entre los manglares, los pastos marinos y los arrecifes de coral que permite el flujo entre las especies que viven en estos ecosistemas (CONABIO, 2009).

La palabra mangle procede de los indígenas Guaraní y significa “árbol retorcido”, se refiere principalmente a la especie *Rhizophora mangle* que tiene raíces en forma de zancos que se sumergen en el agua y que asociados a ellos tienen gran diversidad de fauna y flora (Mejía et al., 2014).

Estos árboles o arbustos, poseen raíces aéreas respiratorias llamadas neumatóforos y tienen la particularidad de ser plantas resistentes a la salinidad del agua (CONABIO, 2009), debido a que tienen estructuras especiales en los tallos y hojas que les ayudan a expulsar el exceso de sal que absorben desde la raíz (Mejía et al., 2014).

Sus frutos, los llamados propágulos, tienen forma de lanza, pueden caer al sustrato y enterrarse en él o flotar durante largos períodos, hasta encontrar un terreno donde desarrollarse (Mejía et al., 2014).

En el mundo se conocen 54 especies de mangle, distribuidas en 20 géneros y pertenecientes a 16 familias. Estas familias no están genéticamente relacionadas, lo que quiere decir que las adaptaciones de estas especies a ambientes salinos se han producido varias veces durante la evolución (CONABIO, 2009).

Los cinco países con mayor superficie de manglar son Indonesia, Brasil, México, Nigeria y Australia (CONABIO, 2009).

### **3.8.1 Importancia de los manglares**

Los manglares controlan la calidad del agua, purificándola, ya que sus sedimentos anaerobios tienen la capacidad de atrapar nutrientes inorgánicos, metales pesados y plaguicidas, sin afectar a los árboles, por ello se consideran como “plantas de tratamiento de agua” y “riñones de la tierra”. También ayudan a estabilizar las condiciones climáticas locales, principalmente la temperatura y la precipitación, y tienen un papel relevante en la captura de carbono, acción que permite purificar la atmósfera (Travieso, s.f.).

Los manglares son capaces de disminuir las inundaciones y servir como una barrera que protege la costa del constante golpe de las olas y de desastres naturales como tsunamis, tormentas y huracanes. Son sitios turísticos que la

gente desea visitar, pueden albergar especies en vía de extinción y especies que tienen un alto valor comercial (Mejía et al., 2014).

Es un ecosistema que ayuda a mantener la red alimenticia de los organismos que habitan en ellos y de los que vienen de ecosistemas vecinos, transfiere alimento en forma de hojas y madera en descomposición. También sirve como refugio y sitio de alimentación de muchas especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Sobre sus raíces crecen pequeños organismos como algas, esponjas, corales, anémonas, ostras y camarones, que aprovechan el alimento suspendido y luego son capturados por peces, cangrejos, estrellas de mar, caracoles y por el hombre (Mejía et al., 2014). Además, es hábitat de aves migratorias y de colonias de reproducción (CONABIO, 2009).

Los manglares también sirven como material de construcción en viviendas rurales, en la fabricación de cercos para la delimitación de los terrenos o el confinamiento de animales para el consumo doméstico y fabricación de artes de pesca como los tapos, en la elaboración de espigas y puntales para la locomoción de pequeñas embarcaciones en zonas someras de las lagunas costeras y los esteros (CONABIO, 2009).

Las especies de mangle han sido usadas con fines medicinales por sus propiedades astringentes y desinfectantes, por ejemplo, para el alivio de enfermedades estomacales, dolores de muela, úlceras, entre otros padecimientos. Los taninos extraídos de estas plantas se usan en el curtido y la tinción. En algunos lugares emplean las hojas como forraje y también se extrae de este ecosistema leña y madera. Esta última se aprovecha para las construcciones rurales y turísticas (casas, muebles, estantes, artesanías, entre otros), la elaboración de carbón y de artes de pesca (Travieso, s.f.).

### **3.8.2 Amenazas**

Pese a sus muchos e importantes usos y beneficios, la fuerte presión demográfica en las zonas costeras ha hecho que a menudo las zonas de manglares se dediquen a otros usos, tales como piscicultura o cría de camarones, agricultura, producción de sal, arrozales y desarrollo urbano. También se han fragmentado y degradado los manglares por la sobreexplotación y la contaminación (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2008).

Según la FAO, en 1980 los manglares abarcaban una superficie cercana a los 19.8 millones de hectáreas de las zonas costeras del mundo, para el año 2005 la misma FAO reporta 15.2 millones de hectáreas, lo que significa que en los últimos 20 años se han perdido el 23% de la superficie mundial. Con las presiones existentes y si la tendencia continúa, se estaría destruyendo uno de los ecosistemas representativos de la biodiversidad del planeta (CONABIO, 2009).

### **3.8.3 Manglares en Guatemala**

La superficie de área con mangle en la República de Guatemala es de aproximadamente 18,839 hectáreas (ha), equivalente al 0.0017% del territorio de Guatemala, pudiéndose encontrar el 93.79% en las costas del Pacífico, lo podría deberse a que la salinidad de la costa del Pacífico es más alta que la de la costa del Atlántico (Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales [MARN], 2013). Del total de superficie de área con mangle solamente el 26.81% se encuentran regulados y protegidos por la ley de Áreas protegidas (CATHALAC Y SIA-MARN, 2012).

Los manglares están ubicados en los departamentos de San Marcos, Retalhuleu, Escuintla, Santa Rosa, Suchitepéquez, Jutiapa e Izabal (INAB, 2011).

Guatemala cuenta con cuatro especies de la clasificación del Sistema de humedal Estuarino:

- Mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.),
- Mangle blanco (*Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaerth),
- Mangle negro (*Avicennia germinans* (L.) L.) y
- Mangle botoncillo (*Conocarpus erectus* L.) (INAB, 2011).

El mangle rojo es el que se encuentra en mayor cantidad en Guatemala, contando con 11,988.41 ha, le sigue el mangle blanco con 6,206.07 ha, luego el mangle negro con 585.03 ha y finalmente el mangle botoncillo con 60.57 ha (MARN, 2013).

### **3.8.4 Mangle botoncillo (*Conocarpus erectus* L.)**

#### **3.8.4.1 Descripción botánica**

Árbol o arbusto, perenne, de hasta 13 metros de altura, de tronco derecho y muy ramificado de color amarillento y de follaje denso; corteza oscura fisurada; las hojas alternas, lanceoladas o elípticas de 3-8 cm de largo por 1.5-3 cm de ancho, coriáceas y levemente carnudas, puntiagudo en ambos extremos, de color verde amarillo en ambas superficies; las flores se dan en los extremos de ramas y en axilas de la hoja y son de color verde-amarillento de pequeñas cabezas, cerca de 5 mm de diámetro en tallos delgados (SEDUMA, s.f.); sus frutos son nueces aladas de 4 mm, agregadas en cabezuelas globosas morenas de 1 a 1.3 cm de diámetro, con todas las partes florales persistentes (CONABIO-PRONARE, s.f.).

#### **3.8.4.2 Hábitat**

No se considera un mangle verdadero, sino más bien una especie que crece en partes elevadas con sustratos arenosos y menos salados

(Mejía et al., 2014); además, por ello puede crecer bajo condiciones de inundación permanente o estacional en sitios con salinidad fuerte y moderada y es moderadamente resistente a las heladas (CONABIO-PRONARE, s.f.).

#### **3.8.4.3 Usos**

La madera se utiliza como leña y carbón, también se utiliza en construcciones rurales, fabricación de instrumentos rústicos, vigas, durmientes. Las ramas se utilizan en la construcción de artes de pesca para el camarón. Las hojas se usan para padecimientos como el asma, ictericia, estado bilioso, evacuaciones pestilentes; la raíz se usa para reumatismo, testículos inflamados; en general la planta se usa para el dolor de cabeza; la corteza es rica en taninos y se utiliza para curtir pieles (CONABIO-PRONARE, s.f.).

#### **3.8.4.4 Composición química**

En el estudio realizado por Abdel-Hameed, Bazaid, Shohayeb, El-Sayed y El-Wakil (2012) sobre las propiedades fitoquímicas, antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas de *Conocarpus erectus* L. en Arabia Saudita, se determinó que los constituyentes mayoritarios eran los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides y taninos; y que las fracciones de *n*-butanol contenían cantidades moderadas de saponinas. Además, el análisis HPLC realizado a las fracciones de acetato de etilo y *n*-butanol de hojas, flores, frutos y tallos reveló la presencia de ácido gálico y rutina en todos los extractos en diferentes concentraciones. Mientras que los otros componentes analizados, catequina, apigenina, quercetina, quercetina-3-O- glucósido, kaemferol-3-O-glucosido y quercetina-3-O-glucosido-ácido gálico, se encontraron en algunas fracciones, en trazas o estuvieron ausentes.

#### 3.8.4.5 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hoja, tallo fruto y flor de *C. erectus*, demostraron alta actividad por el método de DPPH, presentando una  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ; las fracciones de acetato de etilo y n-butanol presentaron una  $CI_{50} < 11 \mu\text{g/mL}$ ; mientras que las fracciones de cloroformo presentaron una actividad leve con una  $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  (Abdel-Hameed, et al., 2012).

Abdel-Hameed, Bazaid y Sabra (2013) demostraron que los extractos metanólicos de hoja, tallo, fruto y flor presentaron alta actividad antioxidante, atribuyéndosele ésta a la presencia de compuestos fenólicos al ser los compuestos mayoritarios de los extractos.

En el estudio realizado por Toj (2016), se elaboraron extractos de corteza y hoja de mangle botoncillo con solventes de distinta polaridad, siendo los utilizados: hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol. Los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante fueron los extractos etanólicos, siendo superior la hoja con respecto a la corteza.

#### 4. Justificación

La radiación ultravioleta puede causar efectos nocivos en la piel, siendo los agudos quemaduras solares, eritemas, fotosensibilidad, y los crónicos el fotoenvejecimiento que puede convertirse en cáncer de piel e inmunosupresión. Por esta razón es necesario desarrollar productos con actividad fotoprotectora que brinden una barrera eficaz contra los rayos UV y que ayude a disminuir la incidencia de cáncer de piel.

Actualmente han aumentado las investigaciones en productos naturales, para determinar sus características farmacológicas para un posible uso en diferentes patologías; entre estas características se encuentra la actividad antioxidante atribuida a los compuestos fenólicos que poseen las plantas. Dicha actividad ha hecho que los mangles se den a conocer para diversos usos como antibacterianos, cicatrizantes, anticancerígenos, entre otros. En Guatemala únicamente se ha investigado la actividad antioxidante y cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. y la actividad antioxidante de *Conocarpus erectus* L.

Por ello se evaluó la actividad fotoprotectora de *Conocarpus erectus* L., el cual está distribuido en las costas de Guatemala. Describiendo la relación entre la cantidad de flavonoides y taninos y el factor de protección solar; para la propuesta de un producto fitocosmético con actividad fotoprotectora, que disminuya los efectos nocivos de la radiación ultravioleta en la piel. Convirtiéndose en una alternativa a los fotoprotectores con agentes orgánicos que presentan efectos adversos y a los agentes inorgánicos que no son aceptados por la población por sus características cosméticas.



## 5. Objetivos

### 5.1 General

- 5.1.1 Evaluar la actividad fotoprotectora *in vitro* del extracto etanólico de las hojas, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L. para la propuesta de una formulación de un producto fitocosmético.

### 5.2 Específicos

- 5.2.1 Detectar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de la hoja, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L. mediante técnicas macro, semimicro y cromatografía de capa fina.
- 5.2.2 Determinar el porcentaje de flavonoides y taninos de los extractos etanólicos de la hoja, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L. por métodos espectrofotométricos.
- 5.2.3 Evaluar el factor de protección solar *in vitro* de los extractos etanólicos de la hoja, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L.
- 5.2.4 Proponer la formulación de un producto fitocosmético de los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L.

## 6. Hipótesis

Los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L. presentan actividad fotoprotectora *in vitro*.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Universo

#### 7.1.1 Población y muestra

Extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L. del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-.

### 7.2 Materiales

#### 7.2.1 Recursos Humanos

Autora: Lorena Elizabeth Rochac Díaz

Asesora: Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

Revisora: Licda. María Nereida Marroquín Tintí

#### 7.2.2 Equipo y Materiales

- Asperjador
- Balanza analítica
- Balanza de humedad
- Balanza semianalítica
- Balones aforados
- Baño maría
- Cajas de petri
- Cámara cromatográfica
- Campana de extracción de gases
- Espectrofotómetro UV-visible
- Estufa eléctrica
- Gradillas
- Incubadora
- Lámpara de luz ultravioleta de onda corta y larga
- Micropipetas

- Micropipetas automáticas de 100  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L.
- Papel filtro Whatman No.1
- Pipeteador automático electrónico para pipetas serológicas
- Potenciómetro
- Refrigeradora
- Sonicador
- Termómetro
- Vortex

### **7.2.3 Reactivos**

- Ácido clorogénico
- Agares
- Disolventes para extracciones, cromatografía en capa fina y análisis en espectrofotometría UV-VIS
- Estándares para cromatografía y espectrofotometría UV-VIS
- Etanol
- Metanol

## **7.3 Métodos**

### **7.3.1 Extracto**

Los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo fueron proporcionados por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-.

### 7.3.2 Tamizaje fitoquímico (Wagner, Blatt y Zgainski, 1984)

#### 7.3.2.1 Investigación de taninos

Ensayo macro y semimicro

Se pesó 0.1 g y se disolvió con 5 mL de etanol, se filtró y evaporó a sequedad, se añadió 10 mL de agua caliente al residuo, se agitó y filtró. Se agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y se filtró. Se adicionó 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: testigo.
- Tubo 2: se agregó de 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1 por ciento (p/v).
- Tubo 3: se agregó de 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1 por ciento de gelatina y cloruro de sodio al 10%).
- Tubo 4: se agregó de 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Detección:

- Se observó la formación de precipitado y/o cambio de coloración.
- Con cloruro férrico: grisáceo-negro: catecol; negro-azulado: pirogalol.

#### 7.3.2.2 Investigación de flavonoides y antocianinas

Ensayo macro y semimicro

Se pesó 0.2 g de extracto en 10 mL de etanol, se disolvió empleando el sonicador y el vortex y se filtró. Se dividió en 5 tubos y se agregó lo siguiente:

- Tubo 1: 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Tubo 2: 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

- Tubo 3: 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).
- Tubo 4: una pizca de magnesio metálico y 0.5mL de ácido clorhídrico concentrado.
- Tubo 5: testigo.

#### Detección

- Se evaluaron las reacciones, cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo.
- Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

#### Ensayo en cromatografía en capa fina

Se extrajo 0.1 g de extracto con 5 mL de metanol, se calentó por 5 minutos en baño de maría a 60°C. Se filtró la solución y se aplicó sobre las cromatoplasmas de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Como estándar se empleó solución de flavonoides al 0.05 por ciento en metanol (10 µL de quercetina, rutina, ácido clorogénico e hiperósido).

Fase móvil: acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27).

#### Detección

- Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, zonas azules o amarillas. UV 365nm, dependiendo la estructura fluorescen amarillo, azul o verde.

- Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG): Fluorescencia intensa en UV-365nm.

Solución 1: solución metanólica al 1 por ciento de difenilboriloxietilamina (NP).

Solución 2: solución etanólica al 5 por ciento de polietilenglicol 4000 (PEG).

### 7.3.2.3 Investigación de alcaloides

Ensayo macro y semimicro

Se pesaron 0.2 g de extracto y se disolvieron en 10 mL de metanol. Se agregaron 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego se añadió 25 mL de metanol a 60°C. Se filtró con papel filtro Whatman 1 y se acidificó el filtrado con ácido clorhídrico 2N. La solución resultante se dividió en 4 tubos y se evaluó de la siguiente manera:

- Tubo 1: se agregó 5 gotas de reactivo de Mayer.
- Tubo 2: se agregó 5 gotas de reactivo de Dragendoff.
- Tubo 3: se agregó 5 gotas de reactivo de Wagner.
- Tubo 4: Testigo.

Se utilizaron como estándares soluciones al 1 por ciento de atropina y papaverina. Se observó durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

Ensayo en cromatografía de capa fina

Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió en 5 mL de metanol, se agregó 1 mL de hidróxido de amonio al 10% y se extrajo con 5 mL de metanol, se acidificó con 2 gotas de ácido clorhídrico 2N. Se calentó

en baño maría a 60°C durante 5 minutos, se filtró y concentró. Se aplicó en la cromatoplaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Como estándares se emplearon las soluciones de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10µL).

Fase móvil: acetato de etilo, metanol, agua (100:13.5:10).

Fase estacionaria: placa de silica gel 60 F254.

#### Detección

- Sin tratamiento químico: En UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo.
- Reactivo Dragendorff: En visible se ven zonas cafés o naranjas, los colores no son estables.

### 7.3.2.4 Investigación de cumarinas

#### Ensayo macro y semimicro

Se pesó 0.1 g del extracto y se disolvió con 5 mL de metanol. Se agregó 1 mL de agua destilada hirviendo y con un capilar se aplicaron 2 manchas en un papel filtro. A una mancha se le agregó 1 gota de hidróxido de potasio 0.5N, se observó bajo luz UV de 365 nm (fluorescencia azul o verde: positivo).

#### Ensayo en cromatografía de capa fina

Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió con 5 mL de metanol. Se filtró y evaporó hasta 1 mL. Se aplicaron 20 µL en la cromatoplaca de silica gel de 60 F<sub>254</sub>. Como estándar se preparó una solución de canela en metanol al 1 por ciento y se utilizaron soluciones de umbeliferona, ácido p-cumárico y cumarina también al 1 por ciento.

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7).



#### Detección

- Sin tratamiento químico; UV 245nm fluorescencia, todas las cumarinas muestran una intensa fluorescencia azul o verde-azul a UV 365 nm.
- Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5 o 10 por ciento, a UV 365 nm fluorescencia azul o verde-azul.

#### 7.3.2.5 Investigación de saponinas

##### Prueba de espuma

- Tubo 1: 100 mg de extracto.
- Tubo 2: 2 mL de control de saponinas (0.5 %).
- Tubo 3: 2 mL de agua.

A cada tubo se le adicionó 10mL de agua destilada, se calentó en baño de maría (60°C) durante 30 minutos y se dejó enfriar. Se taparon los tubos y se agitó vigorosamente durante 30 a 40 segundos. Se dejó reposar los tubos durante 30 minutos y se observó la formación de una capa de espuma. Si una capa de espuma mayor de 3cm persistía en la superficie líquida después de 30 minutos se presumía la presencia de saponinas.

##### Cromatografía en capa fina

Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió con 10 mL de etanol. Se evaporó a 5mL y se procedió a aplicar 25-40  $\mu$ L en una cromatoplaca de silicagel 60 F<sub>254</sub>. Estándar de saponinas al 0.1 por ciento en metanol (10 $\mu$ L).

Fase móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10).

#### Detección

- Reactivo de sangre: Zonas hemolíticas blancas en fondo rojo.
- Reactivo de Liebermann-Burchard: UV-365 o VIS zonas azules y verdes de
- saponinas esteroidales, rojas y violetas de triterpenoides.
- Reactivo de Komarowsky: Zonas azules, amarillas y rojas.
- Vainillina-ácido sulfúrico y anisaldehído-ácido sulfúrico: Zonas azules, violetas, amarillentas.

#### **7.3.3 Cuantificación de flavonoides en base a ácido clorogénico** (Marroquín y Cruz, 2016; Solís y Herrera, 2005).

Se pesó 0.1g de extracto de extracto y se agregó 50ml de agua caliente. Se calentó en baño maría por 60 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se aforó con agua destilada a 100 mL. Se filtró y se diluyó el filtrado 10 veces y finalmente se leyó a 324nm. Se preparó una disolución patrón de ácido clorogénico pesando exactamente 0.1 g de ácido 5-cafeoilquínico y se aforó con agua destilada a un volumen de 500 mL. Por cada dilución se obtuvieron disoluciones con una concentración de ácido clorogénico de 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 mg/L. Se construyó una curva de calibración y en base a la ecuación de la recta se determinó la concentración de flavonoides expresados como ácido clorogénico.

#### **7.3.4 Cuantificación de taninos Tungsto-molibdico-fosfórico** (Marroquín y Cruz, 2016).

Se preparó una solución con 0.5 g de extracto con 250 mL de etanol al 50 %, se agitó durante 1 hora, se dejó en reposo 1 hora y se agitó nuevamente por 3 minutos, para filtrar posteriormente. Se transfirió 3 mL del filtrado a un matraz aforado de 50 mL y se diluyó con agua destilada hasta enrase (Solución madre). Finalmente se prepararon matraces aforados de 25 mL, de acuerdo a lo que muestra la tabla.

## Preparación de muestra para cuantificación de taninos.

<b>Reactivos</b>	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
Solución madre	-	-	0.5 mL
Solución de referencia de ácido tánico	-	1.5 mL	-
Agua destilada	2.5 mL	1.0 mL	2.0 mL
Reactivo para taninos	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Se agita y se deja en reposo 5 minutos			
Solución de carbonato de sodio al 20%	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

Se leyó a 700 nm.

## Preparación de reactivos:

- Solución de referencia de ácido tánico: Se disolvieron 25 mg de ácido tánico en 100 mL de agua destilada, se tomaron 20 mL y completaron a volumen hasta 100 mL.
- Reactivo para taninos: Se pesó 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosfomolibdico y 5 mL de ácido fosfórico al 85% en 75 mL de agua destilada. Se puso en reflujo por 2 horas y se completó a 100 mL con agua destilada.

La expresión para los cálculos se hizo con la siguiente fórmula:

$$X = (A_m * P * 1000 * 100) / (A_p * PM * (100-p))$$

- X: contenido de taninos en la droga (%)
- P: masa de la sustancia de referencia (g)
- $A_m$ : absorbancia de la muestra (nm)
- $A_p$ : absorbancia de la solución de referencia (nm)
- PM: masa de la droga (g)
- p: humedad de la droga (%)

### 7.3.5 Evaluación de la Actividad Antioxidante

#### 7.3.5.1 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (Gudiel, 2009; Marroquín y Cruz, 2016).

- Preparación de la muestra: Se pesó 0.1 g de extracto y se disolvió en 5 mL de metanol, se agitó y sonificó y posteriormente se filtró.
- Preparación de la placa: Se aplicaron 10  $\mu$ L de muestra y 5  $\mu$ L de los estándares antioxidantes ter-butil-hidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, hiperósido, ácido clorogénico y Trolox en la cromatoplaqueta de silicagel 60F<sub>254</sub>.
- Se colocó la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con la fase móvil: acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- Revelado: Se asperjó con el reactivo de DPPH a una concentración de 1mg/mL en metanol, recién preparado protegido de la luz.
- Interpretación de los resultados: Los extractos con actividad antioxidante presentan decoloración del DPPH (morado  $\rightarrow$  amarillo) en las bandas respectivas.

#### 7.3.5.2 Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Marroquín, Cruz y Cáceres, 2012).

Preparación de solución madre: Se pesó 0.1g de extracto seco y se agregaron 5ml de metanol absoluto, luego se sonicó para obtener la solución madre. De esta solución madre se prepararon una serie de diluciones para encontrar el porcentaje de inhibición que esté entre (60-70%), con un  $r^2$  entre 0.97-0.99.

Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>+</sup>) 7mM en agua: Se pesó 38.41 mg y se diluyó con agua hasta 10 mL.

Solución de persulfato de potasio 2.45mM en agua: Se pesó 3.31 mg y se diluyó con agua hasta 5ml.

Formación del catión (ABTS<sup>+</sup>): Se produjo por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45mM, en una proporción 2:1; para lo que se dejó la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso.

Preparación de la solución de uso: La solución ABTS<sup>+</sup> se diluyó con etanol hasta lograr una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734nm y se equilibró a 30°C. Se empleó una dilución 1/30 para obtener dicha absorbancia.

Preparación de los tubos de reacción: Se preparó una serie de tubos que contenían los reactivos que se citan a continuación:

<b>Reactivo</b>	<b>Control</b>	<b>Ensayo</b>
Solución de ABTS <sup>+</sup>	3ml	3ml
Dilución de cada muestra	-----	30µl

Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se preparó por triplicado. El blanco de la corrida fue etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS<sup>+</sup> como la muestra estuvieron en la incubadora a 30°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos.

La lectura de la absorbancia se tomó a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.

Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

= % de inhibición

Luego se graficó la concentración del extracto (eje X) vrs porcentaje de absorbancia (eje Y) y se determinó la ecuación de la recta y el  $r^2$  el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.

La actividad antioxidante se expresó en términos de la concentración de inhibición al 50% (IC<sub>50</sub>), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de ABTS. Para ello se empleó la ecuación de la recta, quedando la fórmula de la siguiente manera:

$$\text{IC}_{50} = (50 - \text{pendiente}) / \text{intercepto}$$

### 7.3.6 Determinación *in vitro* del Factor de Protección Solar

El Factor de Protección Solar (FPS) de la formulación se determinó siguiendo la metodología *in vitro* descrita por Mansur, Breder, Mansur, Azulay (1986). Éste análisis consiste en un método espectrofotométrico en el cual el extracto o la formulación se diluye en etanol absoluto. A través de la fórmula matemática desarrollada según el método, se relacionan los valores de absorbancia obtenidos de las muestras con el FPS de la formulación. El FPS se evalúa en el rango de 290 a 400 nm (rango UVB) (Inocente, et al., 2014).

Para obtener las muestras diluidas de las formulaciones (0,2 mg/mL), se pesó 0.5 g del extracto y formulaciones y se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL, se agregó 50 mL de etanol y se agitó por 5 minutos, luego se diluyó a volumen con etanol y se homogenizó. Una alícuota de 2,0 mL de la

dilución se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se diluyó a volumen con etanol. Las absorbancias de las soluciones se determinan en el rango de 290 a 400 nm, con intervalos de 5 nm utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm. Los análisis se realizaron por triplicado y el FPS se calculó de acuerdo con la ecuación desarrollada por Mansur, et al.

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

Dónde:

FPS = Factor de Protección Solar

FC= 10 (factor de corrección)

EE ( $\lambda$ )= Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda  $\lambda$

I ( $\lambda$ ) = Intensidad del sol en la longitud de onda  $\lambda$

Abs ( $\lambda$ )= Absorbancia de la solución en la longitud de onda  $\lambda$

La relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda ( $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ ) es una constante determinada por Sayre, Desrochers, Marlow (1980).

Constante determinada por Sayre, et al. ( $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ ).

Longitud de onda (nm)	290	295	300	305	310	315	320	Total
EE( $\lambda$ ) x I( $\lambda$ )	0.0150	0.0817	0.2874	0.3278	0.1864	0.0839	0.0180	1000

El factor de protección frente a UVB de un fotoprotector se determina desde 1997 de acuerdo con el estándar de COLIPA o mejor conocido como Cosmetics Europe; éste permite una clasificación según el nivel de fotoprotección:

- Bajo: 2, 4, 6.
- Medio: 8, 10, 12.
- Alto: 15, 20, 25.

- Muy alto: 30, 40, 50.
- Ultra: superior a 50.

### 7.3.7 Evaluación de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los extractos etanólicos

#### 7.3.7.1 Características organolépticas

Parámetro	Método
Aspecto	Visual
Olor	Olfato
Color	Visual

(RTCA 71.03.45:07; Cevallos, 2013).

#### 7.3.7.2 Pruebas físicas (RTCA 71.03.45:07).

- **pH**

Se pesó 0.1 g de muestra, se agregó 10 mL de agua desmineralizada y se leyó con el potenciómetro (Mancilla, 2004).

#### 7.3.7.3 Humedad (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

Se pesaron 0,50 g del extracto y de la crema a examinar en una balanza de humedad y se calentó a 110°C durante 10 minutos.

### 7.3.8 Control microbiológico de los extractos etanólicos (The United States Pharmacopeial Convention, 2007).

Se disolvió 10 g de la muestra en solución amortiguadora de fosfato de pH 7.2, medio líquido de digerido de caseína y soja o medio líquido de digerido de caseína-lecitina de soja-polisorbato 20 para obtener 100 mL.



- **Recuento Total de Microorganismos Aerobios**

Se diluyó el líquido aún más, de ser necesario, para que 1 mL permitiera obtener entre 30 y 300 colonias. Se pipeteó 1 mL de la dilución final y se transfirió a dos placas de Petri estériles. Se agregó inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de medio agar digerido de caseína y soja, previamente fundido y enfriado aproximadamente a 45°C. Se incubó durante 48 a 72 horas a 36°C. Una vez finalizada la incubación, se examinaron las placas para verificar el crecimiento de microorganismos, contándose el número de colonias.

- **Recuento Total de Mohos y Levaduras**

Se pipeteó 1 mL de la dilución final y se transfirió a dos placas de Petri estériles. Se agregó inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de agar Sabouraud. Se incubó durante 5 a 7 días a una temperatura de 20 a 25°C. Una vez finalizada la incubación, se examinaron las placas para verificar el crecimiento de microorganismos, contándose el número de colonias.

### 7.3.9 Desarrollo de la formulación

#### 7.3.9.1 Formulación

##### 7.3.9.2.1 Formulación cualitativa-cuantitativa

Materia prima	Cantidad (%)	Función
Hoja	3	Protector solar
Raíz	3	
Corteza	2.5	
Benzofenona- 4	10	Protector solar
Carbopol	1	Gelificante
Alcohol cetílico	6	Co-emulsionante
Emulgade	5	Emulsionante
Aceite mineral	8	Humectante

Glicerina	6	Humectante
Salicat	0.5	Preservante
Fragancia	1	Aromatizante
Trietanolamina	1	Regulador de pH
Etanol	20	Vehículo
Agua desmineralizada, csp	100	Vehículo

#### **7.3.9.2.1 Preparación de cremas con extracto**

- Se disolvió el extracto en etanol, se agregó al carbopol y se puso a agitar hasta que la mezcla estuviera homogénea y se formara el gel.
- En un beaker se agregaron todos los ingredientes hidrofóbicos (emulgade, alcohol cetílico y aceite mineral) y en otro se agregaron todos los ingredientes hidrofílicos (glicerina, salicat y agua).
- Ambos beakers se pusieron a calentar y se mezclaron hasta que estuvieran a 60°C.
- Luego se agitó hasta que la crema solidificara y estuviera a temperatura ambiente, posteriormente se incorporó el gel con el extracto y se continuó mezclando hasta que la mezcla estuviera homogénea.
- Finalmente, se agregó el aroma, se ajustó el pH con trietanolamina y se envasó.

#### **7.3.9.2.2 Preparación de cremas con extracto y benzofenona**

- Se disolvió el extracto en etanol con ayuda del sonicador.
- En un beaker se agregaron todos los ingredientes hidrofóbicos (emulgade, alcohol cetílico y aceite mineral) y en otro se agregaron todos los ingredientes

hidrofilicos (glicerina, salicat, benzofenona, agua y el extracto disuelto en el etanol).

- Ambos beakers se pusieron a calentar y se mezclaron hasta que estuvieran a 60°C.
- Luego se agitó hasta que la crema solidificara y estuviera a temperatura ambiente.
- Finalmente, se agregó el aroma, se ajustó el pH con trietanolamina y se envasó.

### 7.3.9.3 Control de calidad de la formulación

El RTCA 71.03.45:07 sobre la verificación de la calidad de los productos cosméticos indica las pruebas y especificaciones que se evaluaron en todos los cosméticos.

#### 7.3.9.3.1 Características organolépticas

Parámetro	Método
Aspecto	Visual
Olor	Olfato
Color	Visual

(RTCA 71.03.45:07; Cevallos, 2013).

#### 7.3.9.3.2 Pruebas físicas (RTCA 71.03.45:07).

Se le realizaron las mismas pruebas físicas que a los extractos, siguiendo el mismo procedimiento.

#### 7.3.9.3.3 Pruebas microbiológicas (USP, 2007).

Mismo método para el control microbiológico de los extractos.

Especificaciones de límites microbianos, expresados en UFC/g o UFC/cm<sup>3</sup>.

Determinación	Especificación
Recuento total de mesófilos aerobios	$\leq 10^3$
Recuento total de mohos y levaduras	$\leq 10^2$

(RTCA 71.03.45:07).

Especificación de microorganismos patógenos.

Microorganismo	Especificación
<i>Staphylococcus aureus</i> , por 10 mL	Ausente
<i>Escherichia coli</i> , por 10 mL	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , por 10 mL	Ausente

(RTCA 71.03.45:07).

### 7.3.10 Diseño Estadístico:

Se realizó una investigación de los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de *Conocarpus erectus* L. proporcionados por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-.

#### 7.3.10.1 Tamizaje fitoquímico

El análisis estadístico fue cualitativo, llevándose a cabo una repetición, analizando la presencia o ausencia de alcaloides, taninos, flavonoides y antocianinas, cumarinas y saponinas en hoja, corteza y raíz.

#### 7.3.10.2 Cuantificación de flavonoides y taninos

Se realizó una estadística descriptiva en la cual se determinó la media y la desviación estándar, cada medición se llevó a cabo por triplicado. Se realizó un análisis de varianza y al existir diferencia significativa se llevó a cabo la prueba de Tukey.

#### **7.3.10.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS**

Se realizaron tres mediciones; para el análisis de resultados se realizó una regresión lineal para establecer la ecuación de la recta. Se evaluó la regresión por medio del coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el cual debió ser preferiblemente lo más cercano a 1 para tomar como válida la curva realizada. Las ecuaciones que dieron regresiones significativas sirvieron para calcular la  $CI_{50}$ . Se trabajó con análisis de media y desviación estándar.

#### **7.3.10.4 Características organolépticas y fisicoquímicas de los extractos etanólicos y de la formulación fitocosmética**

El análisis fue cualitativo, en el cual se evaluaron las características organolépticas como aspecto, color, olor, pH y humedad. Además, se realizó el análisis microbiológico en el cual debió cumplir los parámetros del RTCA 71.03.45:07.

#### **7.3.10.5 Factor de protección solar**

La evaluación de la actividad fotoprotectora consiste en un método espectrofotométrico, en el cual se relaciona los valores de absorbancia obtenidos del extracto etanólico y el producto fitocosmético con el factor de protección solar establecido en las constantes determinadas por Sayre. El análisis se realizó por triplicado, siendo una estadística descriptiva en el cual se determinará la media y la desviación estándar.

## 8. Resultados

En la Tabla 1 se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo por el ensayo macrométrico y cromatografía en capa fina, evidenciando la presencia de todos los metabolitos evaluados con excepción de alcaloides.

Tabla 1

*Determinación de metabolitos secundarios de extractos etanólicos de mangle botoncillo.*

Extracto	Órgano	Taninos	Flavonoides	Alcaloides	Cumarinas	Saponinas
Etanólico	Hoja	+	+	-	+	+
	Corteza	+	+	-	+	+
	Raíz	+	+	-	+	+

\*+ presencia, - ausencia.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la cuantificación de los compuestos químicos presentes en los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo. Según los resultados obtenidos la mayor cantidad de ácido clorogénico y taninos lo presentó la corteza.

Tabla 2

*Cuantificación de marcadores químicos de extractos etanólicos de mangle botoncillo.*

Extracto	Órgano	Ácido clorogénico (%)	Taninos (%)
Etanólico	Hoja	4.57 (0.04) <sup>a</sup> [4.55, 4.59]	12.87 (1.68) <sup>a</sup> [11.40, 14.34]
	Corteza	6.59 (0.05) <sup>b</sup> [6.56, 6.61]	23.98 (1.97) <sup>b</sup> [22.25, 23.98]
	Raíz	3.50 (0.05) <sup>c</sup> [3.48, 3.53]	9.30 (0.45) <sup>c</sup> [8.91, 9.70]

\*Las letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.5$  (Prueba de Tukey).

El análisis de varianza demuestra que existe diferencia significativa entre los ácidos clorogénicos y taninos de la hoja, corteza y raíz con un valor  $p < 0.05$ , por lo que puede considerarse que las muestras provienen de poblaciones distintas.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la evaluación de actividad antioxidante del mangle botoncillo por el método cualitativo de CCF, evidenciando que todos los extractos presentaron buena actividad frente al radical DPPH; por el método de ABTS se observó que la mayor actividad la presentó la corteza y en la determinación del FPS UVB *in vitro*, todos los extractos presentan un factor de protección solar bajo a diferentes concentraciones.

Tabla 3

*Evaluación de la actividad biológica de extractos etanólicos de mangle botoncillo.*

Planta	Órgano	Actividad antioxidante	ABTS CI <sub>50</sub>	FPS	Concentración empleada para el FPS (%)
Benzofenona		---	---	6.71 (0.02) [6.68, 6.73]	0.0024
Mangle botoncillo	Hoja	+++*	0.4849 (0.0068) [0.4790, 0.4909]	7.03 (0.00) [7.03, 7.04]	0.015
	Corteza	+++	0.2152 (0.0162) [0.2010, 0.2293]	6.75 (0.00) [6.74, 6.75]	0.01
	Raíz	+++	0.6410 (0.0121) [0.6304, 0.6517]	5.01 (0.01) [5.00, 5.02]	0.0125
Estándares	TBHQ	+++	0.1992 (0.0008) [0.1985, 0.1999]		
	Trolox	+++	0.2726 (0.0006) [0.2721, 0.2731]		
	Quercetina	+++	0.1136 (0.0008) [0.1129, 0.1143]		
	Vitamina C	+++	0.0201(0.0002) [0.1999, 0.2008]		
	Hiperósido	+++	---		
	Rutina	+++	---		
	Ácido clorogénico	+++	---		

\*- Ausencia de actividad, + baja actividad, ++ actividad moderada, +++ buena actividad. ABTS: 2,2'-azinobis-(ácido-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico); CI50: Concentración inhibitoria media.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas fisicoquímicas realizados a los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo. Los tres extractos mostraron coloración diferente, todos presentaron olor dulce, una apariencia entre líquido viscoso a cristalino, homogeneidad y pH de 4.42-5.01. Respecto a la humedad la corteza fue la que mostró un menor porcentaje (6.36%).

Tabla 4

*Propiedades fisicoquímicas de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.*

Extracto	Órgano	Organolépticas			Fisicoquímicas		
		Color	Olor	Descripción	Homogeneidad	pH	Humedad
Etanólico	Hoja	Azabache I2-13	Dulce	Viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	4.42	18.36%
	Corteza	Oaxaca E2-14	Dulce	Cristalino	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	5.01	6.36%
	Raíz	Carey G3-14	Dulce	Líquido viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	4.94	12.43%

En la Tabla 5 se presentan los resultados de las pruebas microbiológicas realizadas a los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo. El único extracto que cumplió con lo establecido para el recuento total de mesófilos aeróbicos fue la corteza, en el caso del recuento total de mohos y levaduras cumplieron la hoja y raíz.



Tabla 5

*Pruebas microbiológicas realizadas a los extractos de mangle botoncillo.*

Extracto	Órgano	Recuento total de mesófilos aeróbicos. Agar PCA	Recuento total de mohos y levaduras. Agar Saboraud
Valor de referencia		≤1000 UFC/mL*	≤100 UFC/mL
Etanólico	Hoja	MNPC 1:10	Cumple
	Corteza	Cumple	MNPC 1:10
	Raíz	MNPC 1:10	Cumple

\*UFC/mL: Unidades formadoras de colonia por mililitros; MNPC: Muy numeroso para contar.

En la Tabla 6 se presenta la composición de las fórmulas utilizadas para la elaboración de las cremas de extracto de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo al 2.5 o 3% y de las mismas con un protector solar químico, benzofenona - 4 al 10%.

Tabla 6

*Composición cuali-cuantitativa de cremas fotoprotectoras.*

Crema	Materia prima	Cantidad (%)	Función
Extracto	Hoja	3	Protector solar
	Raíz	3	
	Corteza	2.5	
	Carbopol	1	Gelificante
	Alcohol cetílico	6	Co-emulsionante
	Emulgade	5	Emulsionante
	Aceite mineral	8	Humectante
	Glicerina	6	Humectante
	Salicat	0.5	Preservante
	Fragancia	1	Aromatizante
	Trietanolamina	1	Regulador de pH
	Etanol	20	Vehículo
	Agua desmineralizada, csp	100	Vehículo

Crema	Materia prima	Cantidad (%)	Función
Extracto y protector solar químico	Hoja	3	
	Raíz	3	Protector solar
	Corteza	2.5	
	Benzofenona- 4	10	Protector solar
	Alcohol cetílico	6	Co-emulsionante
	Emulgade	5	Emulsionante
	Aceite mineral	8	Humectante
	Glicerina	6	Humectante
	Salicat	0.5	Preservante
	Fragancia	1	Aromatizante
	Trietanolamina	1	Regulador de pH
	Etanol	20	Vehículo
Agua desmineralizada, csp	100	Vehículo	

En la Tabla 7 se presentan los resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas a las cremas formuladas con los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo. Las seis cremas mostraron coloración diferente, todos presentaron olor dulce, una apariencia viscosa, homogeneidad, pH de 5 - 6 y humedad de 50.29 - 68.29%.

Tabla 7

*Propiedades físico-químicas de las formulaciones de cremas de mangle botoncillo.*

Crema	Color	Olor	Descripción	Homogeneidad	pH	Humedad
Hoja 3%	Cocodrilo J4-09	Dulce	Viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	6	68.29%
Corteza 2.5%	Dulce de leche H4-06	Dulce	Viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	6	56.71%
Raíz 3%	Nuez H4-04	Dulce	Viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	6	66.48%
Benzofenona 10% + Hoja 3%	Colindres I4-06	Dulce	Viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	5	58.94%
Benzofenona 10% + Corteza 2.5%	África G3-12	Dulce	Viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	5	50.29%
Benzofenona 10% + Raíz 3%	Escorpión G3-03	Dulce	Viscoso	Película homogénea, unifase, sin partículas extrañas	5	56.69%

En la Tabla 8 se presentan los resultados de las pruebas microbiológicas realizadas a las cremas formuladas a partir de los extractos de mangle botoncillo. Todas las cremas cumplieron con el RTCA 71.03.45:07 Productos cosméticos: verificación de la calidad.

Tabla 8

*Pruebas microbiológicas realizadas a las cremas de mangle botoncillo.*

Crema	Recuento total de mesófilos aeróbicos. Agar PCA	Recuento total de mohos y levaduras. Agar Saboraud	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Valor de Referencia	≤1000 UFC*/g	≤100 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente
Hoja 3%	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente
Corteza 2.5%	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente
Raíz 3%	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente
Benzofenona 10% + Hoja 3%	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente
Benzofenona 10% + Corteza 2.5%	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente
Benzofenona 10% + Raíz 3%	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausente	Ausente	Ausente

\* UFC/g: Unidades formadoras de colonia por gramo.

En la Tabla 9 se presenta la cuantificación de taninos en las seis cremas formuladas a partir de los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo. Los rangos de porcentaje de taninos en las cremas estuvieron entre 5.44 - 6.85.

Tabla 9

*Cuantificación de taninos en las cremas formuladas a partir de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.*

Extracto	Taninos (%)
Crema hoja 3%	5.44 (0.00) [5.44, 5.44]
Crema corteza 2.5%	6.64 (0.18) [6.44, 6.84]
Crema raíz 3%	6.85 (0.22) [6.60, 7.11]
Benzofenona 10% + Hoja 3%	6.35 (0.19) [6.14, 6.56]
Benzofenona 10% + Corteza 2.5%	6.67 (0.00) [6.67, 6.67]
Benzofenona 10% + Raíz 3%	6.65 (0.19) [6.43, 6.87]

En la Tabla 10 se presentan los resultados de la evaluación de actividad antioxidante de las cremas formuladas a partir de los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo por el método cualitativo de cromatografía en capa fina, evidenciando que las cremas formuladas únicamente con extractos presentaron una moderada actividad y las cremas formuladas con los extractos y la benzofenona presentaron buena actividad frente al radical DPPH. También se presentan los resultados de la determinación del factor de protección solar UVB *in vitro* realizado a las cremas formuladas a partir de los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo y benzofenona al 10%. Las cremas formuladas únicamente con el extracto presentaron un factor de protección bajo, las formuladas con el extracto y el protector solar químico presentaron un factor de protección muy alto.

Tabla 10

*Evaluación de actividad biológica de cremas formuladas con extractos etanólicos de mangle botoncillo.*

Planta	Extracto	Actividad antioxidante*	FPS	
Crema	Blanco		0.10 (0.01) [0.08, 0.11]	
	Benzofenona 10%	+	25.90 (0.18) [25.69, 26.10]	
	Hoja 3%	++	1.51 (0.03) [1.47, 1.55]	
	Corteza 2.5%	++	7.06 (0.04) [7.02, 7.10]	
	Raíz 3%	++	2.28 (0.03) [2.25, 2.31]	
	Benzofenona 10% + Hoja 3%	++	33.57 (0.08) [33.47, 33.66]	
	Benzofenona 10% + Corteza 2.5%	++	33.47 (0.06) [33.40, 33.53]	
	Benzofenona 10% + Raíz 3%	++	32.14 (0.05) [32.09, 32.20]	
	Estándares	TBHQ	+++	
		Trolox	+++	
Quercetina		+++		
Vitamina C		+++		
Hiperósido		+++		
Rutina		+++		
	Ácido clorogénico	+++		

\* - Ausencia de actividad, + baja actividad, ++ actividad moderada, +++ buena actividad.

## 9. Discusión

El mangle *Conocarpus erectus* L. conocido comúnmente como mangle botoncillo, crece en la costa en partes elevadas con sustratos arenosos y menos salados (Mejía et al., 2014) y está distribuido en regiones tropicales y subtropicales. Ha sido usado tradicionalmente como astringente, como tónico para prevenir la anemia, para la conjuntivitis, diabetes, diarrea, fiebre, dolor de cabeza, entre otros (Abdel-Hameed, et al., 2013). Sin embargo, en todo el mundo los manglares están siendo altamente explotados por las personas, fragmentándolos y degradándolos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2008), por ello es necesario investigar y demostrar la actividad biológica del mangle botoncillo para poder darle un uso sostenible a esta especie.

Además, en la actualidad existe una tendencia al uso de productos naturales en la formulación de cosméticos, por lo que han aumentado las investigaciones en plantas para evaluar su actividad biológica, siendo utilizadas distintas plantas por su actividad fotoprotectora que se ha visto relacionada a la actividad antioxidante. En Guatemala el mangle botoncillo fue estudiado por sus propiedades antioxidantes (Cruz, 2018), lo cual fue una base importante para el presente estudio, por lo que se evaluó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo para posteriormente determinar el FPS de estos.

El tamizaje fitoquímico (Tabla 1) evidenció que los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo presentaron taninos; flavonoides, encontrándose en la hoja por medio de la CCF bandas con un  $r_f$  cercano a los estándares de rutina e hiperósido (Anexo 4); cumarinas presentando la raíz en la CCF una banda con un  $r_f$  cercano a la úmbeliferona; y saponinas; la presencia de alcaloides no se evidenció en ninguno de los extractos. Según un estudio previo realizado en Arabia Saudita, los compuestos mayoritarios en las fracciones de acetato de etilo y *n*-butanol de hoja, tallo, flor y fruto de mangle botoncillo fueron los compuestos fenólicos especialmente los taninos y flavonoides, adicionalmente se identificaron saponinas en las fracciones de *n*-butanol (Abdel-Hameed et

al., 2012), lo cual concuerda con lo encontrado en los extractos en estudio. Los compuestos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos y taninos encontrados en las plantas, conforman uno de los mayores grupos de compuestos que actúan como antioxidantes primarios (Abdel-Hameed et al., 2013), por lo que se cuantificó el contenido de flavonoides y taninos para emplearlos como marcadores químicos para evaluar la calidad del mangle botoncillo.

La cuantificación de flavonoides en base a ácido clorogénico en los extractos (Tabla 2), reveló que la corteza de mangle botoncillo presenta la mayor cantidad (6.59%), seguido por la hoja (4.57%) y por último la raíz (3.50%). Abdel-Hameed y colaboradores (2012) reportaron el contenido de flavonoides como mg de rutina/g de extracto, en el caso de los extractos de acetato de etilo el mayor contenido lo presentó la flor (64.17mg/g), seguido por la hoja (35.31 mg/g) y en el caso de los extractos de *n*-butanol lo presentó la hoja (51.36 mg/g), seguido por la flor (32.26 mg/g); en ambos casos la menor cantidad de flavonoides lo presentó el tallo con valores de 8.47-14.78 mg/g. Cruz (2018) reportó el contenido de ácido clorogénico en material vegetal de mangle negro, mangle botoncillo y mangle blanco en el cual determinaron que la hoja de mangle botoncillo supera a las otras especies ( $4.93 \pm 0.9$  ppm) y que las raíces presentaron la menor cantidad en todas las muestras evaluadas (0.44-0.66 ppm); los extractos de mangle botoncillo presentan un mayor contenido de flavonoides debido a que los compuestos del material vegetal se encuentran concentrados en el extracto, siendo más factible utilizar los extractos para la evaluación de la actividad biológica de la planta.

En la cuantificación de taninos (Tabla 2), el mayor porcentaje lo presentó la corteza (23.98%), seguido por la hoja (12.87%) y por último la raíz (9.30%); Abdel-Hameed y colaboradores (2012) estudiaron el contenido de taninos en las fracciones de cloroformo, acetato de etilo y *n*-butanol de mangle botoncillo, presentando la mayor cantidad de taninos la fracción de *n*-butanol de tallo, fruto y flor, 165.52, 163.22 y 163.22 mg/g de equivalentes de ácido gálico respectivamente, equivalente a 16.55%, 16.32% y 16.32%, por lo que presentan un mayor contenido que los extractos estudiados. Según Cruz (2018) la mayor



cantidad de taninos en mangle botoncillo, evaluado en material vegetal, lo presentó la corteza de mangle botoncillo ( $5.09\pm 0.20\%$ ), seguido por la hoja ( $4.44\pm 0.58\%$ ) y por último la raíz ( $4.42\pm 0.15\%$ ), concordando con los extractos evaluados.

En la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos (Tabla 3) por inhibición del radical de DPPH por medio de cromatografía en capa fina (Tabla 3), todos los extractos presentaron una buena actividad comparada a los estándares. Para determinar la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se utilizó el método de ABTS propuesto en 1993 por Miller, que se basa en la capacidad antioxidante del  $ABTS^+$  para capturar aniones radicales de larga vida, el cual presenta un color verde-azul intenso que disminuye al reaccionar con compuestos con capacidad antioxidante (Rodríguez, Andrade y Diaz, 2015), se evidenció que la mejor actividad la presenta la corteza con un valor de  $CI_{50}$  de 0.2152 mg/mL, seguido por la hoja con 0.4849 mg/mL y por último, la raíz con 0.6410 mg/mL, concordando con la cuantificación de ácido clorogénico y taninos, compuestos fenólicos a los que se les atribuye actividad antioxidante. El extracto de corteza presentó mejor actividad que el estándar trolox ( $CI_{50}$  0.2526 mg/mL) y los extractos de hoja y raíz presentaron valores cercanos a lo de los estándares, por lo que se pueden visualizar como una alternativa a nivel industrial.

Así mismo Abdel-Hameed y colaboradores (2012) reportan una alta actividad antioxidante con una  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  para los cuatro extractos metanólicos sin grasas de mangle botoncillo por el método de DPPH, presentando la mayor actividad el fruto ( $CI_{50}$  6.47  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido por el tallo ( $CI_{50}$  7.24  $\mu\text{g/mL}$ ), las flores ( $CI_{50}$  7.65  $\mu\text{g/mL}$ ) y por último las hojas ( $CI_{50}$  9.40  $\mu\text{g/mL}$ ). El estudio realizado por Cruz (2018) indica que la actividad antioxidante se presentó en los extractos etanólicos de mangle blanco, mangle botoncillo y mangle negro, presentando la mayor actividad el extracto etanólico de hoja de mangle botoncillo ( $CI_{50}$   $0.21\pm 0.02$  mg/mL) por el método de DPPH. Los métodos de ABTS y DPPH muestran diferencias, con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho y Fett, 2005), lo que pudo causar

que en el método de ABTS la mayor actividad antioxidante la presentara la corteza y en el DPPH la haya presentado la hoja.

El factor de protección solar se evaluó de manera *in vitro* contra la radiación ultravioleta B (Tabla 3), la cual induce directa e indirectamente efectos biológicos adversos, como la estimulación de la síntesis de ADN, la producción de radicales libres, el fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis (Saewan & Jimtaisong, 2013). Los tres extractos de mangle botoncillo presentaron un FPS clasificado como bajo según COLIPA; el extracto que presentó mejor actividad fotoprotectora fue el de corteza que a una concentración de 0.01% presentó un FPS de 6.75, esto puede deberse a que se ha atribuido actividad fotoprotectora a los flavonoides, siendo el extracto de corteza el que presentó el mayor contenido de flavonoides expresados como ácido clorogénico y el que presentó la mayor capacidad antioxidante; pero, tanto la hoja como la raíz estuvieron lo bastante cercanos a dicho FPS. La benzofenona-4, presentó un FPS de 6.71 a una concentración de 0.0024%, menor a la empleada por los extractos de mangle botoncillo. Choquet, Coureau, Papis y Coiffard (2008), realizaron cremas con quercetina y rutina a una concentración de 10%, presentando un FPS similar al del homosalato y que al combinarlos con dióxido de titanio presentaron actividad fotoprotectora contra los rayos UVA.

Las características fisicoquímicas de los extractos de mangle botoncillo (Tabla 4), se determinaron utilizando los sentidos de un panel conformado por al menos tres personas (Cruz, 2012), estas propiedades son características para los extractos de cada especie. Los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz presentaron un color característico el cual fue determinado según una carta de color comercial, la hoja presentó un color correspondiente a la gama de anaranjado y la corteza y raíz a la gama de rojo. Los tres extractos presentaron el mismo olor dulce que pudo deberse a la presencia de azúcares (Cáceres, 2006). La descripción de los extractos estuvieron entre líquido viscoso a cristalino y todos se presentaron como una película homogénea, unifase, sin partículas extrañas. El pH de los extractos estuvo entre 4.42-5.01, bastante cercano al pH de la piel que varía entre 4.5 y 5.9 (Orlandi, 2004), siendo ideal para las preparaciones cosméticas. Con respecto a la

humedad, el que presentó el menor valor fue la corteza (6.36%), seguido por la raíz (12.43%) y por último la hoja (18.36%).

El análisis microbiológico (Tabla 5) se evaluó según las especificaciones del Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.45:07 para la verificación de la calidad de productos cosméticos, tanto la hoja como la raíz no cumplieron con los parámetros establecidos para el recuento total de mesófilos aeróbicos, esto puede deberse a que ambos extractos fueron los que presentaron un mayor porcentaje de humedad lo que favorece el crecimiento de bacterias. A su vez, la corteza no cumplió para el recuento total de mohos y levaduras, este extracto fue el único elaborado con etanol al 30%, por lo que a esta concentración el etanol pierde su actividad antimicrobiana.

El producto fitocosmético que se formuló fue una crema fotoprotectora (Tabla 6), debido a que las que existen en el mercado consisten en una mezcla entre agentes inorgánicos, que debido a su carácter opaco y oclusivo suelen ser inaceptables desde el punto de vista cosmético, y agentes orgánicos, que causan reacciones adversas cutáneas y presentan un mayor riesgo de alergias de contacto (Magliano, 2011), por lo que las investigaciones actualmente buscan emplear productos naturales para sustituir estos compuestos o disminuir la concentración en la cual son empleados. Se elaboró una crema para cada uno de los extractos de mangle botoncillo, a una concentración de 2.5% para la corteza y 3% para la hoja y raíz, debido a que esas fueron las máximas concentraciones de extracto que permitían las formulaciones para mantener la emulsión. Adicionalmente, se prepararon tres cremas con la misma concentración de los extractos y un protector solar orgánico, para elevar el FPS, empleándose la benzofenona-4, que presenta actividad fotoprotectora contra los rayos UVB y UVA (Camacho, 2001), a una concentración de 10%.

Las características fisicoquímicas se evaluaron con el mismo procedimiento que los extractos (Tabla 7); la hoja al 3% presentó un color correspondiente a la gama de amarillo; la corteza al 2.5, la raíz al 3% y la hoja al 3% con benzofenona, presentaron un color correspondiente a la gama de anaranjado; y la corteza al 2.5% y raíz al 3% con

benzofenona presentaron un color correspondiente a la gama de rojo. Todas las cremas presentaron un olor dulce, siendo este a pera para las cremas formuladas con el extracto de hoja y de caramelo para las formuladas con los extractos de corteza y raíz. No se pudo medir la viscosidad de las cremas por la poca cantidad de estas, debido a que no se poseía mucho extracto para la formulación, pero todas presentaron una apariencia viscosa, película homogénea, unifase y sin partículas extrañas. El pH fue de 6 para las cremas formuladas únicamente con los extractos y de 5 para las formuladas con el extracto y la benzofenona, por lo que todas se encuentran entre los rangos del pH de la piel. La humedad de las cremas estuvo entre el 50.29 – 68.29%, siendo las cremas formuladas con el extracto de corteza la que presentaron la menor humedad.

El análisis microbiológico de las cremas fue realizado por el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos –LAFYM- (Tabla 8), siendo también evaluado según las especificaciones del Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.45:07. Todas las cremas cumplieron con los parámetros establecidos para el recuento total de mesófilos aeróbicos y para el recuento total de mohos y levaduras, también presentaron ausencia de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, lo que indica que fueron elaboradas en condiciones sanitarias óptimas, siendo aptos para la utilización de los mismos.

Como marcador químico de las cremas se evaluó el contenido de taninos (Tabla 9), siendo importante debido a que el RTCA 71.03.45:07 indica que se le debe realizar pruebas químicas a las cremas de identificación y de contenido de ingredientes activos para poder ser comercializadas. El mayor porcentaje en las cremas elaboradas únicamente con el extracto lo presentó la raíz (6.85%), seguido por la corteza (6.64%) y por último la hoja (5.44%). En el caso de las cremas elaboradas con el extracto y la benzofenona, el mayor porcentaje lo presentó la corteza (6.67%), seguido por la raíz (6.65%) y por último la hoja (6.35%). Cabe resaltar que la corteza presentó valores muy similares a las demás cremas teniendo únicamente un 2.5% de extracto, comparado al 3% de la raíz y la hoja.

En la evaluación de la actividad antioxidante por inhibición del radical de DPPH por medio de cromatografía en capa fina (Tabla 10), la crema con benzofenona presentó una baja actividad, todas las cremas elaboradas con extracto presentaron una actividad moderada y las cremas formuladas con extracto y benzofenona presentaron una buena actividad al igual que los estándares, lo que podría indicar que existe sinergia entre los extractos y la benzofenona.

En la evaluación del FPS de las cremas, las cremas formuladas con el extracto presentaron un FPS bajo, siendo la corteza el que presentó el valor más alto de 7.04, los protectores con un FPS menor a 12 son parcialmente protectores puesto que disminuyen el grado y molestias de la quemadura solar, pero no evitan otras reacciones como daño del ADN y proteico con lo que tampoco se evita la carcinogénesis y fotoenvejecimiento (Camacho, 2001). La crema formulada con benzofenona presentó un FPS de 25.73 considerado como alto y las cremas formuladas con la benzofenona y los extractos presentaron un FPS por arriba de 30, considerado como muy alto, la FDA considera óptimo un FPS de 30 y es el que recomienda usar debido a que bloquea el 96.7% de la energía UV (Camacho, 2001). Esto indica que las cremas formuladas únicamente con los extractos de mangle botoncillo no poseen actividad fotoprotectora, pero el uso de los extractos con un protector solar orgánico, en este caso la benzofenona-4, permite obtener un FPS óptimo disminuyendo la necesidad de agregar más de un agente orgánico evitando de esta manera las reacciones adversas asociadas a estos.

## 10. Conclusiones

- 10.1 Se evidenció la presencia de taninos, flavonoides, cumarinas y saponinas en los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo por medio del ensayo macrométrico y de cromatografía en capa fina.
- 10.2 El extracto etanólico de corteza presentó el mayor contenido de flavonoides y de taninos, 6.59% y 23.98% respectivamente; dichos metabolitos son de interés debido a que se relacionan con la actividad antioxidante y fotoprotectora.
- 10.3 La mayor actividad antioxidante la presentó el extracto etanólico de corteza con una  $CI_{50}$  de 0.2152 mg/mL, existiendo relación entre la concentración de flavonoides y taninos, necesitándose menor concentración de extracto de corteza para la formulación.
- 10.4 El factor de protección solar (FPS) de los extractos etanólicos de hoja, corteza y raíz de mangle botoncillo están clasificados como bajo según COLIPA, al presentar un FPS entre 5 a 7.
- 10.5 Las cremas formuladas únicamente con los extractos de mangle botoncillo no poseen actividad fotoprotectora, pero el uso de los extractos con un protector solar orgánico permite obtener un FPS óptimo disminuyendo la necesidad de agregar más de un agente orgánico, evitando las reacciones adversas asociadas a estos.

## 11. Recomendaciones

- 11.1 Realizar el estudio de estabilidad de las cremas formuladas a partir de los extractos etanólicos de mangle botoncillo y el protector solar orgánico para determinar si conserva sus características fisicoquímicas en condiciones extremas.
- 11.2 Realizar el ensayo de FPS *in vivo* de la ISO 24444:2010 con las cremas formuladas a partir de los extractos etanólicos de mangle botoncillo y el protector solar orgánico, para respaldar los resultados obtenidos del FPS *in vitro*.
- 11.3 Evaluar la actividad cicatrizante de los extractos etanólicos de mangle botoncillo y de las formulaciones, debido al alto contenido que presentaron de taninos y la relación de estos con dicha actividad.

## 12. Referencias Bibliográficas

- Abdel-Hameed, E., Bazaid, S., Shohayeb, M., El-Sayed, M., & El-Wakil, W. (2012). Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*, 2(2): 93-112.
- Abdel-Hameed, E., Bazaid, S., & Sabra, N. (2013). Protective Effect of *Conocarpus erectus* Extracts on CCl<sub>4</sub>- Induced Chronic Liver Injury in Mice. *Global Journal of Pharmacology*, 7 (1), 52-60.
- Cáceres, A. (2006). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- Camacho, F. (2001). Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección. *Dermatología y Dermocosmética Clínica*, 4(7), 441-448.
- CATHALAC Y SIA-MARN. (2012). Cobertura actual del mangle en Guatemala, a través de técnicas de percepción remota. Panamá: CATHALAC.
- Cevallos, M.V. (2013). *Elaboración y control de calidad de una crema corporal hidratante a base de mucílagos y aromas naturales* (Tesis licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Choquenot, B., Couteau, C., Papis, E., y Coiffard, L. (2008). Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: Determination of efficacy by an in vitro method. *Journal of Natural Products*, 71(6), 1117–1118.
- CONABIO. (2009). *Manglares de México: Extensión y distribución*. (2ª ed). México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- CONABIO-PRONARE. (s.f.). *Conocarpus erectus* L. Recuperado de: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/904Conocarpus%20erectus.pdf>
- Cruz, S. (2012). *Evaluación y diseño de una formulación a partir de extractos de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) para un posible uso en cosmética como agente antisolar*. Guatemala: FODECYT 2009.16.



- Cruz, S. (2018). *Evaluación química y biológica de tres especies de mangle distribuidos en la reserva Monterrico para su aprovechamiento y conservación a través de planes de manejo sostenible*. Guatemala: FINDECYT/FODECYT 31-2017.
- González, M., Vernhes, M., y Sánchez, A. (2009). La radiación ultravioleta: su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, 18(2), 69-80.
- González, S., Gilaberte, Y., Philips, N., & Juarranz, A. (2011). Fernblock, a nutraceutical with photoprotective properties and potential preventive agent for skin photoaging and photoinduced skin cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 8466-8475.
- Gudiel, L. (2009). *Evaluación fitoquímica y actividad antioxidante de Polypodium triseriale SW. (calahuala)* (Tesis licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Inocente, M., Tomas, G., Huamán, J., Muñoz, A., García, R., Quispe, G.,... Taype, E. (2014). Actividad antioxidante y fotoprotectora *in vitro* de una loción y gel elaborados con extracto estabilizado de camu camu (*Myrciaria dubia*, Kunth). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(1), 65-77.
- Instituto Nacional de Bosques (INAB). (2011). Manglares de Guatemala. Recuperado de: <http://186.151.231.167/Documentos/Otros/MANGLAR.pdf>
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., y Fett. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726-732.
- López, M. (2007). Fitocosmética solar: plantas medicinales más utilizadas. *Revista de la Oficina de Farmacia*, 26(7), 66-69.
- Magliano, J. (2011). Actualización en fotoprotección. *Tendencias en medicina*, 151-158.
- Mancilla, C. (2004). *Verificación de un sistema de purificación de agua para producción en una industria cosmética* (Tesis licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mansur, J, Breder, M, Mansur ,M, y Azulay, R. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatología*, 61(1), 121-124.

- Marroquín, M., Cruz, S., y Cáceres, A. (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. *Acta horticulturae*, 93-98.
- Marroquín, M., y Cruz, S. (2016). Actividad biológica y caracterización química de los extractos de las hojas y corteza de *Rhizophora mangle* L. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 3(1), 73-81.
- Mejía, L.M., Molina, M.P., Sanjuan, A., Grijalba, M., y Niño, L.M. (2014). *Bosque de manglar: Un ecosistema que debemos cuidar*. Cartagena: Universidad Jorge Tadeo Lozano, Instituto Colombiano de Desarrollo Rural.
- Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARN). (2013). *Informe técnico: Estudio de la cobertura de mangle en la República de Guatemala*. Guatemala: MARN.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2002). *Real Farmacopea Española* (2a. ed.). España: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Mishra, A.K., Mishra, A., & Chattopadhyay, P. (2011). Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 351-360.
- Moreno, M., y Moreno, L. (2010). Fotoprotección. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 18, 31-39.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2008). Estudio temático de FRA sobre manglares. Recuperado de: <http://www.fao.org/forestry/fra/40375/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Índice uv solar mundial: guía práctica. Recuperado de: <http://www.who.int/uv/publications/en/uvispa.pdf>
- Orlandi, M. (2004). Piel sana y manto ácido. *Dermatología Cosmética*, 15(2), 121-124.
- Rai, R., & Srinivas, C. (2007). Photoprotection. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 73(2), 73-79.
- Reglamento Técnico Centroamericano. (2007). *Productos cosméticos: verificación de la calidad*. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- Rodríguez, O., Andrade, W., y Díaz, F. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14(2), 21-36.

- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(9), 129-141.
- Sayre R, Desrochers D, Marlow E. (1980). Sunscreen testing methods: in vitro predictions of effectiveness. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 31(1), 133-43.
- Schalka, S. (2013). Nuevos parámetros en fotoprotección. *Medicina Cutánea Ibero-latinoamericana*, 41(2), 81-94.
- SEDUMA. (s.f.). *Botoncillo*. México: Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente.
- Solís, L. y Herrera, C. (2005). Desarrollo de un método de análisis de cuantificación ácido clorogénicos en café. *Agronomía Costarricense*, 29(2), 99-107.
- The United States Pharmacopeial Convention. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de América 30: formulario nacional 25*. Estados Unidos: The United States Pharmacopeial Convention.
- Toj, K. (2016). *Comprobación de la actividad antioxidante y evaluación de la actividad antiureasa de mangle botoncillo (Conocarpus erectus L.)* (Tesis licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Travieso, A. (s.f.). Manglares. Recuperado de: <http://www1.inecol.edu.mx/costasustentable/esp/pdfs/Publicaciones/VOLI/SECCIONII/Manglares.pdf>
- Vitale, M.A. (2002). Fotoprotección: Conceptos básicos y actualización. *Revista Peruana de Dermatología*, 12(2).
- Wagner, H., Blatt, S., y Zgainski, E. (1984). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

### 13. Anexos

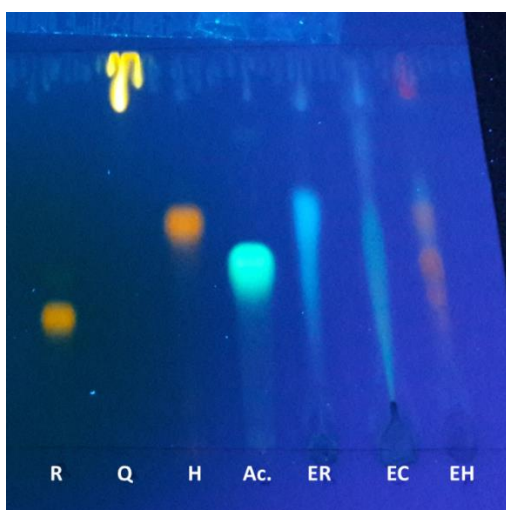
#### 1. Ensayo macrométrico de taninos de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



#### 2. Ensayo macrométrico de flavonoides de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



#### 3. Imagen de la CCF de flavonoides realizada a los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



#### 4. CCF de flavonoides realizada a los extractos etanólicos de mangle botoncillo.

Se realizó la identificación de flavonoides por medio de cromatografía en capa fina CCF a la hoja, corteza y raíz del mangle botoncillo empleando las siguientes condiciones:

- FM: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua; (100:11:11:27)
- Frente de solvente: 7.0 cm
- Estándares:
  - ✓ Rutina: Rf: 0.31, anaranjado,
  - ✓ Quercetina: Rf: 0.70, anaranjado,
  - ✓ Hiperósido: Rf: 0.44, anaranjado,
  - ✓ Ácido clorogénico: Rf: 0.57, azul.

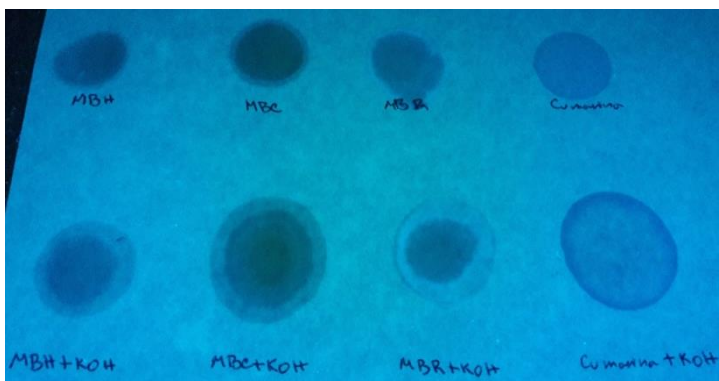
Los resultados se presentan en la tabla evidenciando que todas las muestras presentan flavonoides.

Planta	Extracto	Banda	cm	Color	Rf
Mangle botoncillo	Hoja	1	2.3	Anaranjado	0.33
		2	3.1	Anaranjado	0.44
		3	3.8	Anaranjado	0.54
	Corteza	1	2.5	Verde	0.36
	Raíz	1	3.3	Azul	0.47

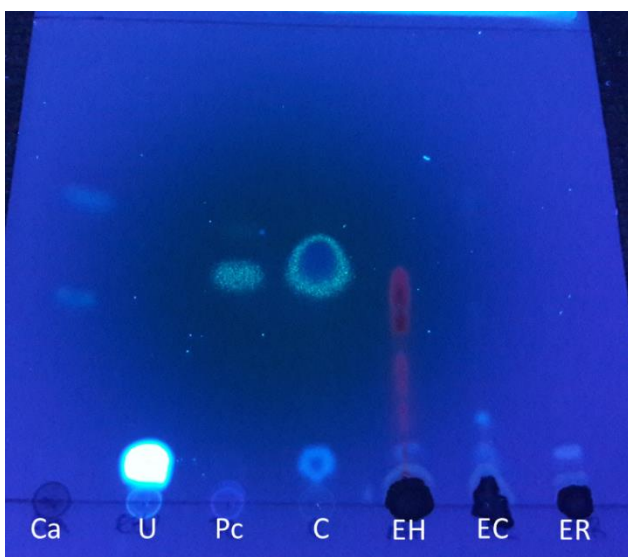
5. Ensayo macrométrico de alcaloides de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



6. Ensayo macrométrico de cumarinas de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



7. Imagen de CCF de cumarinas realizada a los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



## 8. CCF de cumarinas realizada a los extractos etanólicos de mangle botoncillo.

Se realizó la identificación de cumarinas por medio de cromatografía en capa fina CCF a la hoja, corteza y raíz del mangle botoncillo empleando las siguientes condiciones:

- FM: Tolueno-acetato de etilo (93:7)
- Frente de solvente: 7.0 cm
- Estándares:
  - ✓ Extracto de canela: Rf: 0.37, azul,  
Rf: 0.57, azul,
  - ✓ Umbeliferona: Rf: 0.06, azul,
  - ✓ Ácido para-cumárico: Rf: 0.43, verde,
  - ✓ Cumarina: Rf: 0.44, verde.

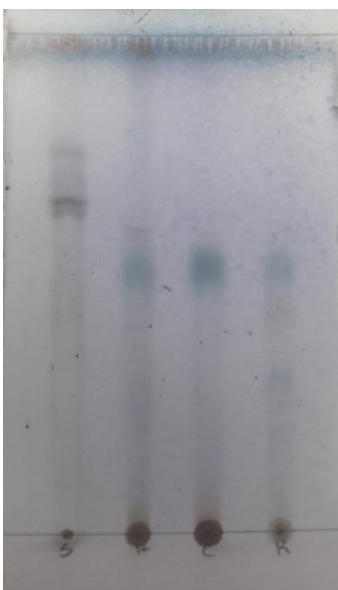
Los resultados se presentan en la tabla evidenciando que todas las muestras presentan cumarinas.

Planta	Extracto	Banda	cm	Color	Rf
Mangle botoncillo	Hoja	1	0.7	Azul	0.10
	Corteza	1	0.7	Azul	0.10
		2	1.1	Azul	0.16
	Raíz	1	0.3	Azul	0.04
		2	0.7	Azul	0.10

9. Ensayo macromético de saponinas de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



10. Imagen de CCF de saponinas realizada a los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



11. CCF de saponinas realizada a los extractos etanólicos de mangle botoncillo.

Se realizó la identificación de saponinas por medio de cromatografía en capa fina CCF a la hoja, corteza y raíz del mangle botoncillo empleando las siguientes condiciones:

- FM: cloroformo-metanol-agua (64:50:10)
- Frente de solvente: 7.1 cm
- Estándares:



✓ Saponinas: Rf: 0.65, morado,

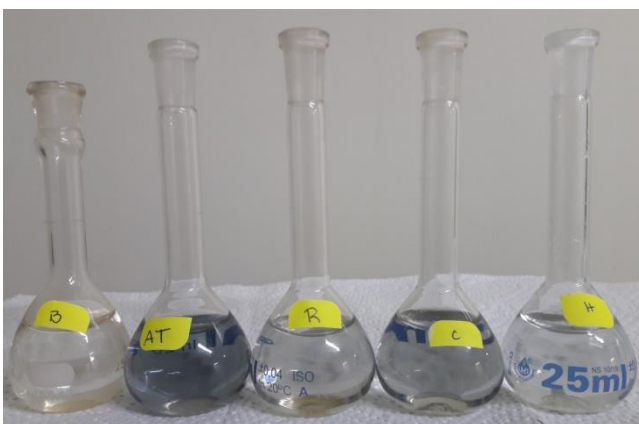
Los resultados se presentan en la Tabla evidenciando que todas las muestras presentan saponinas.

Planta	Extracto	Banda	cm	Color	Rf
Mangle botoncillo	Hoja	1	3.7	Azul	0.52
	Corteza	1	3.7	Azul	0.52
	Raíz	1	2.1	Azul	0.30
		2	3.7	Azul	0.52

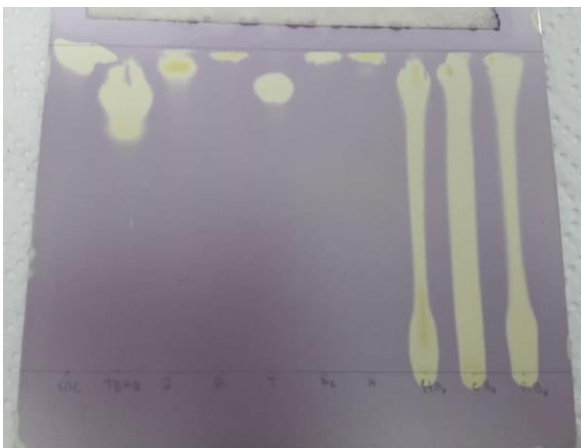
12. Cuantificación de ácido clorogénico de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



13. Cuantificación de taninos de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



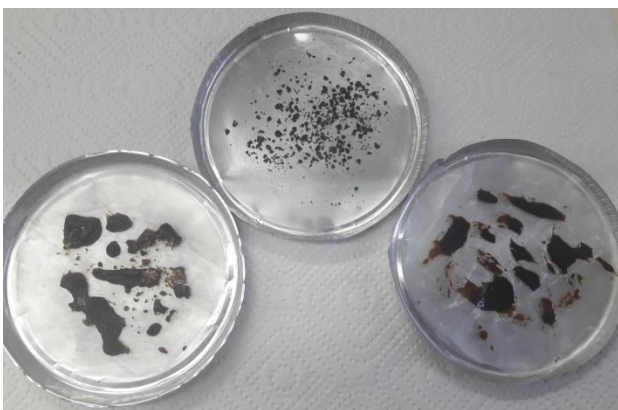
14. Evaluación de la actividad antioxidante de las cremas formuladas con los extractos etanólicos de mangle botoncillo por CCF.



15. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de mangle botoncillo por el método de ABTS.



16. Determinación de humedad de los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



17. Formulación de cremas con los extractos etanólicos de mangle botoncillo.



18. Cremas formuladas con extractos etanólicos de mangle botoncillo.



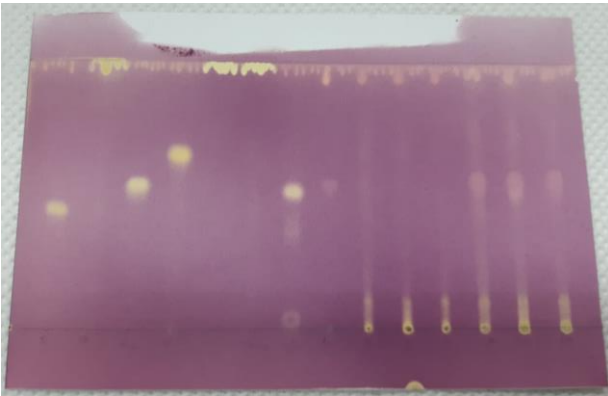
19. Cremas formuladas con extractos etanólicos de mangle botoncillo y benzofenona.



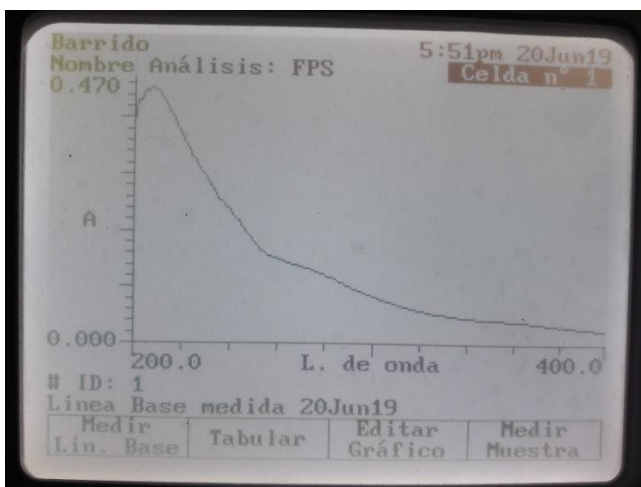
20. Evaluación del color de las cremas formuladas con los extractos de mangle botoncillo.



21. Evaluación de la actividad antioxidante de las cremas formuladas con los extractos etanólicos de mangle botoncillo por CCF.



22. Medición del FPS por espectrofotometría UV.



**Lorena Elizabeth Rochac Díaz**

**Autora**

**Dra. Sully Margot Cruz Velásquez**

**Asesora**

**M.Sc. María Nereida Marroquín Tintí**

**Revisora**

**M.A. Lucrecia Martínez de Haase**

**Diretora de Escuela**

**M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto**

**Decano**