



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**“ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y EFECTO  
FOTOPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL  
TEGUMENTO DE DOS VARIEDADES DE *Phaseolus  
vulgaris* L. ÑUÑA ROJA Y NEGRA”**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

**Br. Mera Santa Cruz, Ermitanio**

**Br. Papuico Sanchez, Liliana Eulalia**

Asesora:

**Dra. Juana Elvira Chávez Flores**

Co-asesor:

**MSC. Richard Andi Solórzano Acosta**

Lima-Perú

2020

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado de manera especial a Dios, a mi hijo, mi madre, mi hermano Orlando y a toda mi familia que me brindó todo el apoyo para cumplir esta meta, también a mi compañera de tesis por su paciencia y apoyo.

Br. Mera Santa Cruz, Ermitanio

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a Dios, mi madre Doris Sanchez, a mis hermanos Elizabeth, Víctor y todas las personas que estuvieron presentes en el proceso en especial a Jefferson Arboleda.

Br. Papuico Sanchez, Liliana Eulalia

## **AGRADECIMIENTO**

Nuestro agradecimiento a la Universidad Norbert Wiener y la toda plana docente que nos permitieron adquirir los conocimientos durante nuestra formación profesional.

A nuestra asesora, Dra. Juana Chávez Flores por compartir sus conocimientos, recomendaciones y sobre todo el apoyo brindado a este trabajo.

A nuestro Co- Asesor, MSC. Richard Andi Solórzano Acosta, por su orientación, apoyo, recomendaciones y dedicación durante todo el proceso del desarrollo de esta investigación.

Así mismo, agradecemos a nuestras familias y amigos por su comprensión, paciencia y solidaridad durante desarrollo de esta investigación.

Br. Mera Santa Cruz, Ermitanio

Br. Papuico Sanchez, Liliana Eulalia

# ÍNDICE DE GENERAL

<b>ÍNDICE DE GENERAL</b>	<b>Pág.</b> <b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>viiix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
- Situación problemática	1
- Marco teórico referencial	3
- Antecedentes internacionales y nacionales	18
- Justificación	25
- Objetivos	26
- Hipótesis	26
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
2.1. Enfoque y diseño	27
2.2. Población y muestra	27
2.3. Variables de estudio	28
2.4. Técnicas e instrumento de recolección de datos	28
2.5. Procedimiento para recolección de datos	37
2.6. Análisis estadístico de datos	377
2.7. Aspectos éticos	377
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>388</b>
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>522</b>
<b>CITAS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>588</b>

<b>ANEXOS</b>	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Operacionalización de variables	77
Anexo 2. Matriz de consistencia	75
Anexo 3. Descripción taxónimica	76
Anexo 4. Análisis estadístico a detalle del Efecto fotoprotector	77
Anexo 5. Vista macroscópica del fotodaño en ratones <i>Mus musculus</i> cepa Balb/C53 según grupo experimental en siete días.	83
Anexo 6 . Evidencias del proceso investigativo	85
Anexo 7 . Certicado de Análisis de L-tirosina	88
Anexo 8 . Certicado de Análisis de Enzima Tirosinasa	89
Anexo 9. Carta del comité de ética	90

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Tipos de radiación solar.	8
Tabla 2. Fototipo de la Piel.	10
Tabla 3. Efecto clínico de la radiación en la piel	11
Tabla 4. Características químicas de la ñuña pava.	17
Tabla 5. Prueba de identificación fitoquímica I	29
Tabla 6. Prueba de identificación fitoquímica II	30
Tabla 7. Descripción de los tratamientos Fotoprotectores	34
Tabla 8. Escala de daño cutáneo de DRAZE	36
Tabla 9. Tipo de fotoenvejecimiento según Goglu.	36
Tabla 10. Resultados del estudio fitoquímico del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra.	38
Tabla 11. Análisis histopatológico de órganos de roedores sometidos a una dosis aguda de extracto de tegumento de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña”.	39
Tabla 12. Efecto fotoprotector de los extractos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña roja” y “ñuña negra” a los siete días.	44
Tabla 13. Grados de edema y fotoenvejecimiento del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra en ratones inducidos por radiación.	59

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Análisis histopatológicos del grupo control.	40
Figura 2. Análisis Histopatológicos del grupo con el tratamiento de Ñuña Roja.	41
Figura 3. Análisis Histopatológicos grupo con el tratamiento de Ñuña Negra.	42
Figura 4. Actividad anti-tirosinasa de los extractos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ñuña roja y negra en cromatografía de capa fina	43
Figura 5. Evolución del grado de eritema en siete días por grupo experimental	45
Figura 6. Evolución del grado de edema en siete días por grupo experimental	46
Figura 7. Grado de eritema a los siete días por grupo experimental	46
Figura 8. Grado de edema a los siete días por grupo experimental	47
Figura 9. Grado de foto envejecimiento a los treinta días por grupo experimental	47
Figura 10. Grados de edema en la piel de ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 tratados con el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra expuestos a radiación UVC.	49
Figura 11. Grados de fotoenvejecimiento en la piel de ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 tratados con el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra expuestos a radiación UVC.	50
Figura 12. Vista microscópica del fotodaño en ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 según grupo experimental en cortes histopatológicos de piel.	51

	<b>Pág.</b>
Figura 13. Vista macroscópica del fotodaño en ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 tercer día de aplicados los tratamientos por grupo experimental	83
Figura 14. Vista macroscópica del fotodaño en ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 al cuarto día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.	83
Figura 15. Vista macroscópica del fotodaño en ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 al quinto día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.	84
Figura 16. Vista macroscópica del fotodaño en ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 al sexto día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.	84
Figura 17. Vista macroscópica del fotodaño en ratones <i>Mus musculus</i> Balb/C53 al séptimo día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.	85
Figura 18. Plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. "ñuña" cultivadas en maceta para la identificación de la especie y Tegumentos de ñuña roja y negra.	85
Figura 19. Proceso de secado y molienda del tegumento y del extracto.	86
Figura 20. Geles preparados por concentración y variedad de ñuña.	86
Figura 21. Identificación cualitativa de componentes fitoquímicos en ñuña roja.	87
Figura 22. Identificación cualitativa de componentes fitoquímicos en ñuña negra.	87



## RESUMEN

La radiación ultravioleta genera problemas de salud sobre la piel y se da en mayor frecuencia, cada vez que no se emplee la fotoprotección adecuada; por ello el presente estudio tuvo como **objetivo** determinar la actividad anti-tirosinasa y evaluar el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra. La **metodología** empleada incluyó: La obtención del extracto a partir del tegumento macerado en etanol al 70%; la actividad anti-tirosinasa se determinó mediante el método cromatográfico en capa fina usando el estándar de ácido Kójico al 0,05 % como control positivo; para la determinación del efecto fotoprotector de carácter experimental se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA) donde se emplearon 35 ratones hembras especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 de siete semanas de edad, divididos en cinco grupos experimentales a los cuales se les afeitó el lomo y se les aplicó radiación UV-C por 30 minutos una vez al día durante un mes, concomitante a ello se les aplicó un gel a diferentes concentraciones de cada variedad: 2 y 5 % P/V según los tratamientos planteados en el lomo de los animales. Se evaluó el fotodaño agudo mediante la escala de Draize midiendo el grado eritema y edema; y el grado de fotoenvejecimiento empleando la escala de Glogau. Los **resultados** encontrados indicaron que el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra presentó: quinonas, flavonoides, taninos, azúcares reductores, resinas, polifenoles, lípidos, alcaloides, lactonas, leucoantocianidinas, saponinas y polisacáridos; que es prácticamente no tóxico en ratones por vía oral y dérmica a dosis límite de 5000 mg/kg; tiene actividad anti-tirosinasa por determinación cualitativo evaluado por cromatografía en capa fina y aplicado en gel al 5%, en mayor grado la variedad roja y tiene efecto fotoprotector en ratones sometidos a la radiación UVC. La **conclusión** a la que se llega es que el extracto etanólico del tegumento de ñuña negra al 5% en gel tiene efecto fotoprotector.

Palabras clave: Actividad anti-tirosinasa, Efecto fotoprotector, *Phaseolus vulgaris* L.

## ABSTRACT

Ultraviolet radiation generates health problems on the skin and occurs more frequently, every time the adequate photoprotection is not used; Therefore, the present study aimed to determine the anti-tyrosinase activity and evaluate the effect Photoprotector of the ethanolic extract of the integument of two varieties of *Phaseolus vulgaris* L. "ñuña" red and black. The **methodology** used included: Obtaining the extract from the tegument macerated in 70% ethanol; anti-tyrosinase activity was determined by thin layer chromatography method using the 0.05% Kojic acid standard as a positive control; For the determination of the photoprotective effect of an experimental nature, a completely randomized design (DCA) was used where 35 female mice species *Mus musculus* strain Balb / C53 of seven weeks of age were used, divided into five experimental groups to which the back was shaved. and UV-C radiation was applied to them for 30 minutes once a day for a month, concomitant to this, a gel was applied at different concentrations of each variety: 2 and 5% W / V according to the treatments proposed on the back of the animals. Acute photodamage was evaluated using the Draize scale, measuring the degree of erythema and edema; and the degree of photoaging using the Glogau scale. The **results** found indicated that the ethanolic extract of the integument of two varieties of *Phaseolus vulgaris* L. "ñuña" red and black presented: quinones, flavonoids, tannins, reducing sugars, resins, polyphenols, lipids, alkaloids, lactones, leucoanthocyanidins, saponins and polysaccharides ; that it is practically non-toxic in mice by oral and dermal route at a limit dose of 5000 mg / kg; it has anti-tyrosinase activity at a qualitative level evaluated by thin layer chromatography and applied on a 5% gel, to a greater degree the red variety and has a photoprotective effect in mice subjected to UVC radiation. The **conclusion** reached is that the ethanolic extract of the ñuña negra tegument at 5% in gel has a photoprotective effect.

**Keywords:** Anti-tyrosinase activity, Photoprotective effect, *Phaseolus vulgaris* L.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Situación problemática

La energía radiante del sol constituye un recurso valioso para el hombre porque es parte esencial del proceso fotosintético, de la síntesis de la vitamina D, producción de serotonina y melanina, así como la absorción de calcio en los huesos. La radiación solar que llega a la Tierra se clasifica como: Luz visible, infrarroja y la ultravioleta; esta última se subdivide en tres bandas: UVA, UVB y UVC; sin embargo, la creciente contaminación ambiental ha generado que producto del deterioro de la capa de ozono cada vez atraviese mayor cantidad de radiación ultravioleta que genera problemas de salud sobre la piel en especial como: arrugas prematuras, manchas e incluso cáncer, todo ello en mayor ocurrencia y medida cada vez que no se emplee la fotoprotección adecuada <sup>(1)</sup>.

Según la Organización Mundial de Salud (OMS), desde comienzos de los años setenta se ha incrementado la incidencia de cánceres de piel, estrechamente vinculado a las costumbres personales de exposición al sol y en particular a la radiación ultravioleta (UV) <sup>(2)</sup>. En Perú el Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI) informó que en el 2019 los niveles de radiación ultravioleta UVB y UVA se ha incrementado fluctuando entre 12 y 18 considerados extremadamente alto, ello se convierte en un problema de salud pública debido a la escasa cultura de fotoprotección en nuestra sociedad.

La exposición prolongada y/o directa a la radiación solar genera diversas afecciones a nivel dérmico debido a su alta intensidad los mecanismos de defensa de la piel en forma natural no son suficientes; por ello es necesario tomar medidas de protección, utilizando fotoprotectores dada la tendencia actual y la sensibilidad de la piel como órgano de protección, que no sean tóxicos y amigables con el medio ambiente <sup>(3)</sup>.

Es así como en la búsqueda de activos fotoprotectoras de origen natural, en investigaciones anteriores, evaluaron por diferentes métodos el efecto fotoprotector de diversos extractos de plantas con alto contenido de compuestos fenólico y flavonoides <sup>(4)</sup>, estas sustancias pueden reemplazar a los filtros solares químicos ya que se ha comprobado que absorben los rayos en la región del UV (UVB 280-320 nm y UVA 320-400 nm) y además poseen poder antioxidante <sup>(5)</sup>.

La hiperpigmentación de la piel es producto de la estimulación de tirosina aumentando la concentración de melanina, inducida por la radiación solar, es un problema de salud tales como: Foto envejecimiento, manchas, eritema y en casos patológicos como: El melasma, lentigo senil, melanoma hasta cáncer melánica y no melánica. Existen fármacos que inhiben la actividad anti-tirosinasa tales como la hidroquinona, en el año 2016 en el país Ghana ha prohibido el uso de este, debido a que se reportaron casos de citotoxicidad, por ellos se buscan nuevas alternativas más seguras y con menos reacciones adversas; algunos compuestos que contiene la ñuña como: Polifenoles, flavonoides entre otros metabolitos han demostrado actividad anti-tirosinasa uno de los mecanismos que se inhibe la producción melanina <sup>(6)</sup>.

En el Perú, existen diversidad de plantas con compuestos fenólicos y flavonoides con potencial fotoprotector; sin embargo, es importante revalorizar aquellas plantas como los cultivos subutilizados, entre ellos la “ñuña” (*Phaseolus vulgaris* L.) que en nuestro país no es aprovechado aun eficientemente y su cáscara que es rica en compuestos fenólicos es desechada la mayoría de veces para el uso industrial de su semilla; a pesar de que se cultiva en los departamentos de Cajamarca, Cuzco, Ancash, Huánuco, Apurímac, La Libertad y Ayacucho <sup>(7)</sup> además constituye uno de los legados valiosos de la agricultura andina, teniendo su centro de origen en la sierra del Perú, donde existe gran diversidad genética como resultado de miles de años de domesticación y posee alto contenido de proteínas <sup>(8)</sup>, por

todo lo expuesto, la presente investigación tiene como objetivo determinar la actividad anti-tirosinasa y el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” debido a la alta cantidad de compuestos polifenólicos y flavonoides, que tienen un bajo costo y pueden aprovecharse eficientemente.

## **1.2 Marco teórico referencial**

### **1.2.1 La enzima tirosinasa**

Esta enzima tiene 519 aminoácidos <sup>(9)</sup>. Puede obtenerse de múltiples fuentes, como bacterias, hongos, plantas y mamíferos <sup>(10)</sup>. Esta enzima cumple un rol importante, la producción de melanina <sup>(11)</sup>. La melanogénesis es limitada por la acción de la tirosinasa <sup>(10-11)</sup>.

#### **1.2.1.1 Estructura y función de la tirosinasa**

Esta cuproproteína se une a dos átomos de Cobre (Cu) a través de los dominios ricos en histidina <sup>(12)</sup>. El lugar catalítico de la enzima incluye dominios ligadores de Cu, la quelación de Cu inhibe la tirosinasa <sup>(13)</sup>. Sin embargo, en los mamíferos están asociados a la membrana con orgánulos específicos (melanosomas) <sup>(14-15)</sup>.

#### **1.2.1.2 Histología de la melanogénesis**

La piel funciona como un órgano de defensa de primera instancia (entre 2 y 2.5 m<sup>2</sup>) <sup>(16)</sup> y participa en la defensa inmunológica del organismo y en la detección de estímulos sensoriales <sup>(17)</sup>.

La epidermis es un epitelio con multitud de tipos celulares entre las que enfatizan los queratinocitos, las células de Merkel, las células dendríticas y los melanocitos, que son células muy especializadas localizadas a nivel de la membrana basal de la epidermis y cuya función principal es la formación de los pigmentos polifenólicos; melaninas; mientras que la dermis está formada principalmente por fibroblastos <sup>(18)</sup>.

### 1.2.1.3 La melanogénesis

Es una serie de reacciones enzimáticas cuya función es transformar la tirosina en pigmentos melánicos <sup>(19)</sup>, este mecanismo se efectúa en el melanosoma <sup>(20)</sup>. El melanocito tiene un tamaño pequeño y posee unas prolongaciones dendríticas, cargadas de gránulos de melanina, donde se encuentra confinada la enzima tirosinasa 1 y 2 <sup>(21)</sup>.

La melanina se sintetiza en las organelas celulares especializadas, llamados melanosomas y se elaboran en los melanocitos que se encuentran principalmente en la piel (en la capa basal de la epidermis) y en la parte inferior de los folículos piloso <sup>(22)</sup>.

La melanina, es de color marrón o negro <sup>(23)</sup>. La feomelanina de color amarillo anaranjado. Estos dos pigmentos derivan de un precursor común, la dopaquinona <sup>(24)</sup>. Los tipos y cantidades de melanina se determinan genéticamente y están influenciados por los cambios hormonales, la inflamación, la edad y la exposición a la luz ultravioleta <sup>(25)</sup>. Es importante mencionar que el número de melanocitos es similar en todas las razas, pero los melanosomas son de mayor tamaño y más abundante en la raza negra <sup>(26)</sup>.

### 1.2.1.4 Biosíntesis de melaninas

A partir de la dopaquinona, se da la síntesis de la eumelanina y la feomelanina <sup>(22)</sup>. “La vía de síntesis de la eumelanina (eumelanogénesis) requiere la presencia de otras tres enzimas, la proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TYRP1), la proteína relacionada con la tirosinasa 2 (TYRP2) y la dopacromo tautomerasa (DCT), mientras que la vía de síntesis de la feomelanina (feomelanogénesis) requiere la incorporación de derivados azufrados” <sup>(27)</sup>. El punto de bifurcación entre las eumelaninas es cuando la tirosina se transforma en dopaquinona, que se forman por polimerización de índoles <sup>(28)</sup>.

### **1.2.1.5 Regulación de la melanogénesis**

El incremento de producción de melanina es causado por sobreexposición a la radiación ultravioleta <sup>(29)</sup>.

### **1.2.1.6 Papel de las radiaciones ultravioleta en la melanogénesis.**

La radiación ultravioleta (UV) pertenece a la franja del espectro electromagnético con longitudes de onda entre 100 y 400 nm aproximadamente <sup>(30)</sup>. La luz UV se subdivide en tres subclases: (a) UV-A (320-400 nm), (b) UV-B (290-320 nm) y (c) UV-C (200-290 nm). La melanogénesis es regulada en primera instancia por la radiación UVA y UVB de la luz solar <sup>(31)</sup>.

La radiación UVB puede actuar sobre los melanocitos, directamente, y estimular la melanogénesis <sup>(31)</sup>. La exposición de los queratinocitos a los rayos UVB produce numerosos agentes que regulan la diferenciación, el crecimiento y la melanogénesis <sup>(27)</sup>. La eumelanina es capaz de absorber los fotones y captar los radicales libres lo que impide el daño del ADN protegiendo a la piel <sup>(31)</sup>. A pesar de ello, algunos estudios recientes sugieren que la feomelanina participa en la generación del melanoma por mecanismos de daño no oxidativo del DNA <sup>(32-33)</sup>.

### **1.2.1.7 PKC- $\beta$ y activación de tirosinasa**

PKC- $\beta$  es una proteína quinasa implicada en la regulación de la biosíntesis de melaninas <sup>(34)</sup>. PKC- $\beta$  activada está asociada con la membrana melanosomal y se ubica solo en los melanocitos <sup>(35)</sup>. La fosforilación de tirosinasa parece conducir a la formación de complejos entre tirosinasa y TRP-1 esto provoca que la tirosinasa sea más estable y que, por tanto, aumente su actividad enzimática sobre los melanocitos <sup>(36)</sup>.

### 1.2.1.8 Compuestos inhibitorios de la tirosinasa:

#### Naturales

##### 1. Polifenoles

Conforman diversas moléculas inhibitorias de la tirosinasa y otras acciones como: antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora que pueden utilizarse como agentes preventivos <sup>(37)</sup>. Los polifenoles son considerados sustratos de tirosinasa o inhibidores de ella <sup>(38)</sup>.

##### 2. Flavonoides

Presentan diferentes funciones, la principal; actúan como captadores de radicales libres, evitando la peroxidación lipídica producto de la radiación ultravioleta; además se ha evaluado su acción inhibitoria de la enzima tirosinasa <sup>(39-40)</sup>.

#### Sintéticos

##### 1. Hidroquinona (HQ)

Es un agente despigmentante que tiene como mecanismo de acción inhibir la enzima tirosinasa, alterar la estructura de los melanosomas e inducir a efectos necróticos sobre el melanocito. La concentración indicada es de 2%, a mayor porcentaje tiene que estar supervisado por un dermatólogo. Debido a sus reacciones adversas la FDA le ha quitado la seguridad a este fármaco por citotoxicidad reportada <sup>(41)</sup>.

##### 2. Rucinol (4-n-butil resorcinol)

Es un derivado del resorcinol e inhibe a la tirosinasa. Se ha demostrado alta tolerancia y no es citotóxico y la concentración usualmente utilizada es de 0,3% <sup>(42)</sup>.

##### 3. Ácido azelaico (azelaic acid)

Según estudios *in vitro* tiene la capacidad para inhibir la tirosinasa. En el tratamiento de cloasma se usan concentraciones de 15 a 20% bajo prescripción médica <sup>(42)</sup>.



#### **4. Ácido kójico (kojic acid)**

Inhibe la melanogénesis por diversas vías, una de ellas la inhibición de la enzima tirosinasa. Presenta alta tolerancia y está indicado en el tratamiento de melasma, efélides y léntigo senil a concentraciones de 1-3% <sup>(42)</sup>.

#### **5. Arbutina (arbutin)**

Esta molécula es derivada de la hidroquinona. Se usa por lo general al 1% y no tiene efecto carcinogénico ni citotóxico <sup>(42)</sup>.

### **1.2.2 Efecto Fotoprotector**

#### **1.2.2.1 La radiación**

Está formada por un espectro continuo de emisiones electromagnéticas de diversas longitudes de onda, en estas últimas décadas el nivel de estas se ha incrementado <sup>(43)</sup>. La radiación solar es capaz de lesionar la piel y ojos <sup>(44)</sup>.

**Tabla 1. Tipos de radiación solar <sup>(45)</sup>.**

<b>Tipo</b>	<b>Longitud de onda</b>	<b>Acción</b>	<b>Capacidad de penetración</b>	<b>Efectos</b>
Ultravioleta	UVC 200-290 nm	Biológica	Epidermis	Carcinogénico Eritema inmediato
	UVB 290-320 nm		Epidermis	Fotoinmunosupresión Bronceado Cáncer no melanoma Fotoenvejecimiento
	UVA 320-400 nm		Niveles profundos de la dermis	Sensibilización Melanoma
Visible	400-800 nm	Luminosa	Hipodermis	Fototoxicidad Fotoalergia
Infrarroja	800-1000 nm	Calorífica	Hipodermis	Vasodilatación Aumento de la temperatura Eritema Deshidratación

### **1.2.2.2 Los fotoprotectores**

Son sustancias que pueden absorber, reflejar o dispersar fotones de radiación UV <sup>(46)</sup> <sup>(47)</sup>. Un fotoprotector es aquel que puede evitar los daños a nivel cutáneo o inclusive reparar los fotodaños <sup>(48)</sup>.

Entre sus efectos protectores se puede mencionar:

1. Absorción directa de fotones
2. Inhibición de la inflamación crónica
3. Modulación de la inmunosupresión
4. Inducción de apoptosis;
5. Antioxidante directo (neutralizar/atrapar especies reactivas del oxígeno ERO)
6. Antioxidante indirecto <sup>(49)</sup>.

Se tiene que tener en cuenta que, los fotoprotectores tienen que ser seguros tanto como para los seres humanos como para el medioambiente <sup>(48)</sup>.

### **1.2.2.3 Fototipo de piel**

Cada persona tiene un nivel de melanina, que determina un tipo o fototipo de piel en función a ello se puede clasificar a la población en seis grupos diferente <sup>(49)</sup>. Esta clasificación fue desarrollada en 1975 por el Dr. Fitzpatrick y actualmente es muy utilizada para recomendar un factor de protección <sup>(4)</sup>.

**Tabla 2. Fototipo de la Piel <sup>(3)</sup>.**

<b>Fototipo</b>	<b>Acción del sol sobre la piel (no protegido)</b>	<b>Características pigmentarias</b>
Fototipo I	Presenta intensas quemaduras solares, casi no se pigmenta nunca y se descama de forma sostenible	Individuos de piel muy clara, ojos azules, pelirrojo y con pecas en la piel. Su piel, habitualmente no está expuesta al sol y es de color blanco-lechoso.
Fototipo II	Se quema fácil e intensamente, pigmenta ligeramente y descama de forma notoria.	Individuos de piel clara, pelo rubio, ojos azules y pecas, cuya piel, que no está expuesta habitualmente al sol, es blanca.
Fototipo III	Se quema moderadamente y se pigmenta correctamente.	Razas caucásicas (europeas) de piel blanca que no está expuesta habitualmente al sol.
Fototipo IV	Se quema moderada o mínimamente y pigmenta con bastante y de forma inmediata al exponerse al sol.	Individuos de piel morena o ligeramente amarradonada, con pelo y ojos oscuros (mediterráneos, mongólicos, orientales)
Fototipo V	Raramente se quema, pigmenta con facilidad e intensidad (siempre presenta reacción de pigmentación inmediata)	Individuos de piel amarradonada (amerindios, indostánicos, árabes e hispano)
Fototipo VI	No se quema nunca y pigmenta intensamente (siempre presentan reacción de pigmentación inmediata)	Razas negras.

#### **1.2.2.4 Efecto de la radiación sobre la piel <sup>(40-41)</sup>.**

La penetración de la radiación ultravioleta (UVA, UVB) y la luz visible en las diferentes capas de la piel provocarán una cascada de alteraciones presentando patologías a nivel de la estructura celular como:

- a. Regeneración de las especies de reactivación de Oxígeno (ROS)

- b. Generación de radicales libres (radical superóxido, óxido nitroso y radical hidroxilo),
- c. Activación de la matriz de melanoproteínas (MMP's) que producen arrugas y envejecimiento prematuro.
- d. Promueven la pigmentación irregular
- e. Ocasionan alteraciones de foto sensibilidad y urticaria solar.

**Tabla 3. Efecto clínico de la radiación en la piel <sup>(50)</sup>.**

<b>Exposición aguda</b>	<b>Exposición Crónica</b>	<b>Exposición Intermittente</b>
Bronceado	Fotoenvejecimiento	Carcinoma basocelular
Quemadura solar	Transmonto de pigmentación Queratosis actínicas Carcinoma	Melanoma

**1.2.2.4 Los efectos clínicos de la radiación de la piel son:**

**1. Quemadura solar (Eritema)**

La exposición aguda a la luz solar, provocan daño visible en la piel manifestándose como una respuesta inflamatoria a las 2-6 horas de la exposición observándose eritema, edema, dolor y vascularización <sup>(51)</sup>.

**2. Fotosensibilidad.**

La fotosensibilidad, se puede desarrollar como foto alérgica (frecuentes y limitadas al área expuesta) y fototóxica (va más allá del área expuesta por acción de UVA) <sup>(49)</sup>.

**3. Dermatitis por fotoexposición y fotoagravadas.**

Se presenta como alteraciones pigmentarias <sup>(52)</sup>. Se puede presentar como hiperpigmentación de diversos tonos sobre las zonas fotoexpuestas.

#### **4. Fotoenvejecimiento.**

Es un proceso biológico precoz y se caracteriza por líneas de expresiones finas y marcadas, anomalías vasculares (cuperosis, telangiectasia, lagos venosos), hiperpigmentación, hiperplasia sebácea y en fases tardías melanomas <sup>(42)</sup>.

#### **5. Fotocarcinogénesis (cáncer de piel).**

La radiación es un agente carcinogénico, esta patología se presenta en zonas expuestas a altas radiaciones sin fotoprotector <sup>(32)</sup>.

#### **6. Alteraciones oculares:**

Los ojos son órganos que están expuestos a la radiación solar, las diferentes enfermedades que pueden presentar son: la fotoqueratitis (ceguera de la nieve), cataratas, pterigium, pinguecula, carcinoma de células escamosas de conjuntiva y córnea <sup>(52)</sup>.

### **1.2.2.5 Protección de la piel frente a la radiación**

La piel tiene diferentes mecanismos de defensa <sup>(52)</sup>, estos pueden ser:

#### **Protección natural**

La dermis dispone diversos mecanismos naturales para absorber o desviar la radiación solar ellas son:

##### **1. Barrera cutánea**

Cumple un rol inicial importante, cuya función es de reflexión, de difracción y de absorción fotónica de la queratina que produce epidermopoyesis, teniendo como resultado una hiperqueratosis.

## **2. Sistema pigmentario**

La producción de eumelanina es máxima con relación a la feomelanina, que se comporta como un fotosensibilizador agresivo para las células.

## **3. Pigmentos carotenoides**

Su rango de absorción va desde 450 hasta 700 nm, por lo que su acción es nula frente a los rayos UV, sin embargo, actúan como antirradicales.

## **4. Enzimas antioxidantes**

Son responsables de la defensa antirradicales, cumpliendo con la función fotoprotectora de la melanina y queratina cutánea, entre estos tenemos: superóxido dismutasa, peroxidasa, glutatión.

## **5. Pulosidad**

Tiene una función protectora muy importante, se basa en los mismos mecanismos de acción de la queratina, antes mencionados.

## **6. Sistema de reparación ADN**

Son los mecanismos de última línea que reparan los daños del material genético provocados por los fotones que escaparon a los medios de fotoprotección precedentes. El fototipo determina la fotosensibilidad individual <sup>(44)</sup>.

### **1.2.2.6 Mecanismo de acción de los protectores solares**

En su mecanismo de acción se utilizan dos procesos: Dispersión y absorción <sup>(45)</sup>. Asimismo, estos filtros solares pueden ser clasificados de acuerdo a su función como:

#### **1. Filtros físicos o pantallas solares**

Son partículas que actúan como una barrera física cuya función es reflejar y difundir la radiación UV, IR y luz visible <sup>(48)</sup>. En la actualidad estas partículas son nanosomas mejorando la

textura y absorción del producto <sup>(37)</sup>. La Unión Europea solo permite el uso de nanopartículas de un tamaño superior a 30 nm y deben estar recubiertas de alúmina o sílice <sup>(41)</sup>. Las sustancias que son empleadas son:

- a) Óxido de zinc
- b) Dióxido de titanio
- c) Óxido de magnesio
- d) La mica o el talco

## **2. Filtros químicos**

Actúan dispersando y absorbiendo la radiación mediante reacciones químicas que producen calor <sup>(48)</sup>. Como principales filtros químicos destacan:

- a) Ácido para-amino benzoico (PABA)
- b) Ácido Cinámico
- c) Ácido Sulfónico
- d) Alcanfor
- e) Benzofenona
- f) Dibenzoilmetano

La legislación cosmética regula los filtros químicos y establece las concentraciones que deben emplearse para garantizar su total inocuidad.

## **3. Filtros biológicos**

Son agentes antioxidantes que evitan la formación de radicales libres, a la vez actúan como reparadores <sup>(48)</sup>. Las moléculas empleadas son: Las vitaminas A, E, C y sustancias naturales con efecto fotoprotector como los carotenoides y flavonoides <sup>(42)</sup>. Por sí mismos no bloquean la radiación solar si no que actúan contrarrestando la acción nociva del sol <sup>(49)</sup>.



### 1.2.3 Especie en Estudio

#### 1.2.3.1 Aspectos botánicos

La ñuña, es una planta enredadera de aproximadamente 2 a 3 metros de altura la cual produce una gran cantidad de vainas y flores. Estas leguminosas se diferencian por su diversidad genética, puede presentar diferentes coloraciones como: Negro, rojo, amarillos, mixtos entre otros <sup>(7)</sup>.

#### 1.2.3.2 Clasificación taxonómica

Dentro de la familia de las leguminosas se encuentra el género *Phaseolus* incluye más de 35 especies el nombre común en zona de los andes del Perú es ñuña <sup>(53)</sup>.

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae*

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

Sus frutos son vainas que tienen la forma alargada que contiene varios granos de semillas con forma esférica de diferentes tamaños y colores <sup>(54)</sup>.

#### 1.2.3.3 Origen, distribución geográfica y hábitat

Desde el Pre-inca y la civilización Incaicas se han conocido como “Purutu”. Son considerados los frijoles más antiguos sometidos al tostado. En la Cueva Guitarrero en Ancash Perú se le han encontrado por lo que presume que la ñuña puede tener 1000 años de edad <sup>(54)</sup>. Existen variedades de frijol reventón, a los cuales en cada departamento del Perú se les denomina de forma diferente: “frijol”;

“ñuña”, “ñuña apa” “poroto” o “puspo” <sup>(55)</sup>. La ñuña tradicionalmente son cultivadas para el consumo humano <sup>(54)</sup>.

Son cultivadas en los departamentos de Huánuco, La Libertad, Ancash, Junín <sup>(54)</sup>. En Apurímac se ubican varias ñuñas llamadas “Ccanka purutu” por el color particular de sus semillas, como se aprecia debido a su amplia localización en el Perú presenta una diversidad genética como resultado <sup>(55)</sup>.

#### **1.2.3.4 Beneficios de la familia *Phaseolus***

Esta leguminosa tiene un costo accesible para la población, además es un alimento completo rico en proteínas, fibra dietética, hierro, hidratos de carbono complejos, minerales, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados; se caracteriza por estar libre de colesterol. Además de estos componentes nutricionales, contiene una amplia variedad de fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, que incluyen antocianinas, proantocianidinas, flavonoles, ácidos fenólicos, e isoflavonas; los cuales le confieren beneficios potenciales para la salud, tales como reducción de riesgo a enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, cáncer y enfermedades del tracto digestivo <sup>(56)</sup>.

#### **1.2.3.5 Usos Tradicionales**

##### **Tostado del grano**

La capacidad de reventar es una cualidad importante en los frijoles tipo ñuña <sup>(57)</sup>. La calidad de grano seco está en gran medida determinada por el contenido de humedad <sup>(7)</sup>.

En el Perú los granos de ñuña son cocinadas friéndolas durante 5 a 10 minutos, cubriendo su superficie con aceite y la ñuña revienta saliendo de la envoltura de la semilla y el producto resultante es suave y de sabor agradable <sup>(58)</sup>.

### 1.2.3.6 Aspectos bioquímicos

El grano de frijol es una fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos, vitamina B, fibra, minerales y nutraceuticos con alta actividad antioxidante, como: Flavonoides, antocianinas, polifenoles, taninos, entre otros” <sup>(55)</sup>. El color de la semilla está determinado por la presencia y concentración de flavonoides, se han reportado en las semillas de frijol de color negro mayor concentración de antocianinas <sup>(56)</sup>, demostrando propiedades antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes <sup>(58)</sup>.

### 1.2.3.7 Composición química y valor nutricional del frijol Ñuña

Es considerado una fuente de fundamental en la alimentación del hombre <sup>(58)</sup>, contribuye a una dieta balanceada <sup>(56)</sup>. El análisis bromatológico determina que 100 g de porción comestible contiene: Humedad 11 por ciento, proteína 22,1 mg, lisina 1,593 mg, metionina 234 mg, cisteína 188 mg, triptófano 223 mg total aminoácidos esenciales 8457 mg. La ñuña tiene elevado contenidos de aminoácidos esenciales <sup>(55)</sup>.

**Tabla 4. Características químicas de la ñuña pava <sup>(55)</sup>.**

<b>Características</b>	<b>Base húmeda (%)</b>	<b>Base seca (%)</b>
Humedad	11,13	-
Proteína	20,52	23,09
Ceniza	4,33	4,87
Fibra	2,09	2,32
Grasa	1,26	1,42
Carbohidratos	60,67	68,27
Calcio (*)	167	187,91
Fósforo (*)	378	425,34
Hierro (*)	4,9	7,76

(\*): Expresado en mg

### 1.3 Antecedentes internacionales y nacionales

- Tarquino (2018), en Bolivia, investigo la “Valoración fotoprotectora *in vitro* de extractos fenólicos a partir de cuatro variedades de quinua (*Chenopodium quinoa willd*) de la provincia Aroma departamento de la paz. **Objetivo:** Evaluar la capacidad fotoprotectora de extractos ricos en compuestos fenólicos y actividad anti-tirosinasa *in vitro*. **Metodología:** La Actividad Anti-Tirosinasa se determinó por ensayo espectrofotométrico (prueba colorimétrica), determinada mediante espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm, medida por su coloración amarilla. **Resultados:** Se determinó que la variedad QA mostró tener contenido mayoritario de compuestos que absorben en el rango de radiación UVA y UVB y el extracto de la variedad QK mostro una inhibición para la enzima Tirosinasa, de un 34%. **Conclusión:** La variedad de quinua QA presentó mayor contenido de compuestos fenólicos que absorben la radiación UVA y UVB mientras que la variedad QK mayor porcentaje de inhibición con 34,03% respecto a las demás variedades estudiadas<sup>(59)</sup>.
- Tobar (2016) en Ecuador, investigó la “Determinación de la actividad fotoprotectora *in vitro* de los extractos de *Chenopodium murale* plantas medicinales frente al daño solar”. **Objetivo:** Evaluar la actividad fotoprotectora de la planta Malla (*Chenopodium murale*). **Metodología:** Elaboraron suspensiones bacterianas de *Escherichia coli* de acuerdo con el estándar McFarland 0.5, en tubos de cuarzo y se formaron unidades experimentales con los extractos de 20 ppm, 200 ppm y 2000 ppm, mediante radiación UVB se produjo la muerte celular de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) en 7 repeticiones. **Resultado:** El extracto etanólico a 2000 ppm presentó la actividad fotoprotectora más elevada con una tasa de viabilidad celular del 10,75% evidenciando el crecimiento celular de las cepas de *Escherichia coli* después de haber

sido sometidas a dicha radiación. **Conclusión:** La planta estudiada presentó actividad fotoprotectora <sup>(60)</sup>.

- García et al. (2016), en México, realizaron los estudios sobre la “Cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en Frijol”. **Objetivo:** Evaluar el contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante en muestras poblacionales pertenecientes a Oaxaca. **Metodología:** Separaron de grano y testa (tegumento) para determinar el contenido de polifenoles totales, mediante el método espectrofotométrico modificado de Singleton y Rossi (1965) se determinó la concentración expresándose en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g<sup>-1</sup> bs), la actividad antioxidante se realizó por el método de Brand-Williams et al. (1995). Expresándose en micro moles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca (μmol Eq Trolox g<sup>-1</sup> bs). **Resultado:** Se obtuvo un intervalo de 78,29 a 218 mg EAG g<sup>-1</sup> bs, en cuanto a la actividad antioxidante se obtuvieron valores en un intervalo de 813 a 1789,2 μmol ETrolox g<sup>-1</sup> bs. **Conclusión:** Se obtuvieron mayores concentraciones de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa que en el grano de frijol <sup>(61)</sup>.
- García (2016), en México, realizó un estudio denominado “Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa de 54 poblaciones nativas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)”. **Objetivo:** Identificar y cuantificar compuestos fenólicos con actividad antioxidante presentes en frijol. **Metodología:** Mediante el método descrito por Singleton y Rossi, (200 μL del reactivo de Folin Ciocalteu se adiciono en 400 μL del extracto y se dejó reposar durante 5 a 8 minutos sin presencia de luz, se agregaron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7% y 1,4 mL de agua esterilizada, se agitó y después de una hora se leyó su absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro) Se cuantificó los compuestos fenólicos mediante

una curva estándar de ácido gálico (0,02-0,12 mg/mL-1) siendo reportado como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g-1 bs **Resultados:** Los polifenoles totales en testa, fue de 1,33 - 248,97 mg EAG g-1 bs, flavonoides de 0.15-24.23 mg ECat g-1 bs. **Conclusión:** Existe mayor concentración de compuestos fenólicos y en la testa de frijol, en la variedad negro y rojo, en comparación con las demás variedades <sup>(62)</sup>.

- Del Gaudio et al. (2015), en Bolivia, investigó sobre “Extractos bioactivos de especies de *dalea*: Evaluación de actividad anti-tirosinasa y antifúngica.” **Objetivo:** Evaluar la inhibición de la enzima tirosinasa y antifúngica de los extractos etanólicos de las raíces de las especies mencionadas. **Metodología:** El ensayo anti- tirosinasa, fue evaluado según el método de Rahman et al. utilizando tirosinasa de champiñon y como sustrato L-tirosina (1,7mM); el patrón estándar fue Ácido Kójico (AK), la aparición de dopacromo se midió en espectrofotómetro UV a 475nm en dos concentraciones (0,05 a 100 µg/mL) y se estimó la  $CI_{50}$  de cada extracto. **Resultados:** Se determinó que el extracto más activo sobre la enzima tirosinasa fue el obtenido de *Dalea pazensis*, (0,116±0,001) µg/mL con una  $CI_{50}$  que demuestra que es 14 veces más activo que el inhibidor de referencia ácido Kójico. **Conclusiones:** Concluyeron que el extracto de mayor actividad fue el de *Dalea pazensis* (0,116±0,001) µg/mL, que sería futuro candidato para el tratamiento de patologías hiperpigmentantes o como despigmentante en cosmética <sup>(63)</sup>.
- Belmar (2014), en España, realizó una investigación sobre el “Estudio del efecto de polifenoles vegetales sobre un modelo de Fotoenvejecimiento en ratones SKH1 evaluó las propiedades de los extractos de granada, fresno y uva, como posibles fotoprotectores.” **Objetivo:** Estudiar el efecto de la exposición crónica a la radiación

ultravioleta en un modelo de foto-envejecimiento cutáneo animal.

**Metodología:** Sometieron a radiación ultravioleta 48 ratones hembra SKH-1/CRL, 60 minutos por sesión, tres veces por semana, por 75 sesiones, con una energía total absorbida por animal de 1,688 J/cm<sup>2</sup>. Los ratones se dividieron en cuatro grupos. El primero sólo recibió RUV (Control) y los otros tres se administraron oralmente los antioxidantes.

**Resultado:** El extracto de granada presentó una reducción de las áreas lesionadas en un 97,56% respecto al grupo control, de un 90% en la incidencia de carcinomas invasores y de un 38,67% en la tasa de proliferación tumoral (PCNA). **Conclusiones:** La exposición crónica a la radiación ultravioleta provocó, en todos los animales del grupo control, la foto-carcinogénesis cutánea, a diferencia de los que fueron tratados las lesiones que presentaron fueron más tardías esto se debe a contenido de polifenoles <sup>(64)</sup>.

- Chugden et al. (2019), en Perú, realizaron un estudio sobre el “Efecto fotoprotector de una crema a base del extracto hidroalcohólico del *Mauritia flexuosa* l.f. (aguaje) en ratones albinos” **Objetivo:** Evaluar el efecto fotoprotector de una crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico del *Mauritia flexuosa* l.f. (Aguaje) realizado en 5 grupos de ratones albinos. **Metodología:** Se utilizaron 15 ratones cuyos pesos variaron entre 30 y 35 g, se depiló el lomo de los ratones albinos, formándose 5 grupos de trabajo (control, blanco, crema al 10%, crema al 15% y bloqueador), al grupo blanco se le aplicó crema base; el grupo control fue utilizado como grupo de comparación; a un grupo de ratones se le aplicó crema a base de extracto de aguaje al 10%, a otro grupo de ratones, crema de aguaje al 15% y a otro grupo de ratones se les aplicó una crema bloqueadora comercial, las cremas fueron administradas diez minutos antes de ingresar a la cámara UV, durante una hora, dos veces al día, expuesto directamente a la luz UVA 320- 400 nm, por un periodo de 7 días. Al terminar el experimento se realizaron cortes

longitudinales de la piel de los ratones y pasaron a ser evaluados por la patóloga para evidenciar el grado de lesión que presentan. **Resultados:** Los resultados reportados fueron lesiones leves específicamente eritemas, validando que los efectos del aguaje a base de una crema al 10% del extracto hidroalcohólico *Mauritia flexuosa* l.f. tiene efecto fotoprotector. **Conclusiones:** Concluyen que la crema al 10%, a base del extracto hidroalcohólico de *Mauritia flexuosa* l.f. (Aguaje) presento mayor efecto fotoprotector que la crema al 15%<sup>(65)</sup>.

- Aquino et al. (2018), en Perú, investigaron la “Evaluación de la capacidad fotoprotectora de una crema elaborada a base del extracto antociánico obtenido de los frutos de la *Muehlenbeckia volcanica* (mullaq’a) en ratones de la raza *Mus musculus* variedad Balb/C53”. **Objetivo:** Evaluar la capacidad fotoprotectora del extracto de los frutos de la *Muehlenbeckia volcánica* en una crema base. **Metodología:** Extracción con cloroformo–acetona (70:30 v/v), se formularon las cremas base a 3 concentraciones (0,5, 1,0 y 1,5%) del extracto, para determinar el efecto fotoprotector, determinando el grado de eritema y edema durante 72 horas luego de la irradiación, para los cambios inflamatorios; y evaluando la intensidad de daño en la piel cambios morfológicos. **Resultado:** El nivel de eritema y edema son menores con cremas 1,0 y 1,5%; y la intensidad de daño en la piel es menor con las cremas 0,5 y 1,0%. **Conclusión:** La crema al 1,5% con el extracto antociánico tiene mayor protección en los cambios morfológico y tiene menor intensidad de daño <sup>(66)</sup>.
- Malca et al. (2018), en Perú, realizaron una investigación sobre el “Desarrollo de una crema a base del extracto de *Passiflora quadrangularis* L. tumbo y evaluación *in vitro* de su efecto fotoprotector.” **Objetivo:** Desarrolló una crema fotoprotectora a base del extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis* L. “tumbo” y determinar el efecto *in*



*vitro*. **Metodología:** Las absorbancias para el efecto *in vitro* de la crema fotoprotectora solar se midieron en la región de la radiación UVB (290 a 300 nm, Según la metodología de FPS *in vitro* descrita por Sayre y Mansur et al. **Resultados:** El FPS de la crema fotoprotectora a concentraciones de 0,5, 1 y 1,5% del extracto fue de 29,06; 33,57 y 37,45, respectivamente. Los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de la crema fotoprotectora estuvieron dentro de los rangos permitidos. **Conclusión:** Concluyeron que la crema fotoprotectora a base del extracto de hojas de *Passiflora quadrangularis* L. a las concentraciones elaboradas tuvieron un factor de protección alto <sup>(67)</sup>.

- Giurfa y Oblitas. (2017) en Perú, realizaron un estudio sobre “Polifenoles, actividades antioxidantes, anti elastasa, anti colagenasa, efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollo de una forma dermocosmética”. **Objetivo:** Determinar la presencia de polifenoles, actividad antioxidante, anti elastasa, anti colagenasa y el efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollar una forma dermocosmética. **Metodología:** El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se determinó por neutralización de (DPPH) y (ABTS•+). El efecto fotoprotector fue evaluado *in vivo* en 30 ratones albinos adultos machos de la especie *Mus musculus* Cepa Balb C53 que fueron distribuidos en seis grupos. Se elaboraron cremas al 1,3 y 5 % (con el extracto hidroalcohólico) y se aplicaron en la piel de los ratones en el tercio anterior dorsal del lomo, para luego ser irradiados con luz UV-B. **Resultados:** El extracto vegetal presentó mayor concentración de polifenoles (0,629 mg de equivalentes de ácido gálico/g alga seca), y actividad antioxidante (IC<sub>50</sub> = 11 mg/mL el C<sub>50</sub> = 90,9 mg/mL) frente al estándar Trolox® (IC<sub>50</sub> = 5,6x10<sup>-3</sup> mg/mL e IC<sub>50</sub> = 154,33x10<sup>-3</sup> mg/mL), el efecto fotoprotector se evidenció en el análisis macroscópico

e histopatológico de la piel, donde se observaron diferencias favorables en el extracto hidroalcohólico del rizoide frente a una crema comercial FPS 50. **Conclusión:** Concluyen que el extracto hidroalcohólico de *Lessonia nigrescens* Bory, presenta polifenoles, actividad antioxidante *in vitro* y actividad fotoprotectora *in vivo* <sup>(68)</sup>.

- Salas et al. (2016), en Perú, investigaron los “Polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en cuatro variedades de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo seco, remojado y cocido”. **Objetivos:** Determinar polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en cáscara, cotiledón y grano entero de cuatro variedades de frejol: “Sumaq puka”, “Huasca”, “Huallaguino” y “Panamito”, en los estados crudo, remojado y cocido. **Metodología:** La cuantificación de polifenoles totales se siguió el método de Folin – Ciocalteu donde se realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm. Para la evaluación de la capacidad antioxidante se utilizaron los métodos del radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH), se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a 517 nm con intervalos de 30s por un tiempo de 10 min. Y capacidad de inhibir el radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS <sup>o+</sup>) en el cual la absorbancia se registró a 734 nm por espacio de 10 minutos. **Resultados:** El mayor porcentaje de polifenoles se obtuvo en la cascara y cotiledón de frejol “Huallaguino”, se determinó el coeficiente de inhibición que fluctuó entre IC<sub>50</sub> 0,26 a 15,26 mg/mL; y 0,01 - 1,38 mg/mL. **Conclusión:** El mayor contenido de polifenoles totales en frejol crudo seco, remojado y cocido lo presentó la cáscara y cotiledón de “Huallaguino y la mayor capacidad antioxidante presentó el frejol “Huallaguino” <sup>(69)</sup>.

## 1.4 Justificación

### El presente trabajo se justifica:

- a. **Aspecto salud:** No existe la menor duda sobre el peligro de la sobreexposición al sol; sin embargo, las precauciones para evitar las consecuencias de la radiación solar acumulativa, por ello la presente investigación permitirá encontrar una alternativa de origen natural para evitar lesiones inmediatas que van desde un pequeño enrojecimiento de la piel a auténticas quemaduras, o lesiones tardías como foto-envejecimiento prematuro, fotosensibilidad, queratosis actínicas, cáncer de piel e hiperpigmentación cutánea.
- b. **Aspecto económico:** La ñuña presenta compuestos que pueden ser estudiados para conocer qué tan viables o aplicables son en seres humanos para cumplir con el objetivo de protección frente a la radiación; ello permitirá la prevención del foto-daño e hiperpigmentación, al contar con recurso natural de bajo costo y promover el cultivo ya que el potencial de este tipo de frijol aun es poco explorado pues no se le ha dado la importancia como producto innovador dentro de la economía tradicional de los pueblos andinos; tanto así, que sólo se concentra en pequeños cultivos de las zonas de tierras altas de Perú.
- c. **Aspecto social:** Contribuirá con la identificación de nuevos compuestos que podrían ser utilizados como filtros solares naturales, los mismos que después de los estudios correspondientes podrán ser aprobados para ser empleados en formulaciones tópicas, ya sea en conjunto con otros filtros o en solitario. Así se podrá ir mejorando la protección contra la radiación UV y disminuyendo la incidencia de cáncer de piel e hiperpigmentación cutánea en nuestro país.

## 1.5 Objetivos

### - Objetivo general

Comprobar la actividad anti-tirosinasa y el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra.

### - Objetivos específicos:

1. Determinar cualitativamente la presencia de los componentes fitoquímicos presentes en el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra.
2. Evaluar la toxicidad aguda a dosis límite de 5000 mg/kg del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra, en ratas Holtzman.
3. Determinar la actividad anti-tirosinasa del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra por el método cualitativo mediante cromatografía en capa fina.
4. Evaluar el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra en ratones inducidos por radiación.

## 1.6 Hipótesis

### Hipótesis de investigación

El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra tiene actividad anti-tirosinasa y efecto fotoprotector.

### Hipótesis nula:

H<sub>0</sub>: El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra no tiene actividad anti-tirosinasa.

H<sub>0</sub>: El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra no tiene efecto fotoprotector.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Enfoque y diseño

El estudio es de carácter experimental y se empleará el diseño completamente aleatorio (DCA).

### 2.2. Población y muestra

La población del estudio experimental estuvo constituida por ratones hembras de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 y *Phaseolus vulgaris* L. (ñuña).

Muestra vegetal: Tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. ñuña roja y negra.

Reactivo biológico: 42 ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 cuyos pesos oscilen entre 25 y 30 g.

Criterios de inclusión:

1. Ratones de la cepa *Mus musculus* cepa Balb/C53
2. Ratones hembra
3. Peso 25 a 20 g
4. Ratones 7 semanas de edad.

Criterios de exclusión:

1. Ratones que no pertenezcan a la cepa *Mus musculus* cepa Balb/C53
2. Ratones que no sean del sexo hembras
3. Ratones que estén fuera del peso de entre 25 a 20 g
4. Ratones menores 7 semanas de edad.

### **2.3. Variables de estudio**

Variable dependiente:

- Actividad Anti-tirosinasa
- Efecto Fotoprotector

Variable independiente:

- El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra.

### **2.4. Técnicas e instrumento de recolección de datos**

#### **2.4.1 Metodología**

##### **2.4.1.1 Adquisición de semillas de ñuña:**

Los granos de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” se obtuvo en el mes de septiembre del 2019 en el distrito Yauyucán en el mercado de abastos a una altitud de 2400 m.s.n.m. Provincia de Santa Cruz, departamento de Cajamarca, donde se eligió dos tipos o variedades de ñuña de según el color del tegumento rojo y negro.

##### **2.4.1.2 Preparación del extracto**

Se utilizó 7 kilos de frijol por cada variedad y se remojo en 7 L de agua destilada durante 12 horas. Se separó manualmente el grano de la cáscara (tegumento). El tegumento se pulverizó por separado utilizando un molino (Corona)<sup>(69)</sup>.

La muestra seca se macero por 7 días con etanol/agua (80:20 v/v) en agitación continua, la solución obtenida se concentró en el rotavapor (BUCHI)<sup>(60)</sup>.

##### **2.4.1.2 Análisis cualitativo fitoquímico preliminar.**

**Determinación fitoquímica cualitativa se realizaron mediante reacciones de colación y precipitación utilizando el método descrito por Lock <sup>(75)</sup>.**

**Tabla 5. Prueba de identificación fitoquímica I**

<b>Ensayo de identificación</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Indicador positivo</b>
<b>Identificación de Compuestos reductores: Ensayo de Fehling</b>	2 mL de Rvo. de Fehling A + 2 mL de Fehling B + calentamiento/ebullición por 1 minuto + 1 mL de extracto / ebullición por 1 minuto	Coloración rojo ladrillo
<b>Identificación de Esteroides: Ensayo Liebermann-Burchard</b>	0.5 mL de extracto + 0.5 mL de Anhídrido acético, 1ml Ácido Acético y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado	Coloración azul, verde o naranja.
<b>Identificación de Lípidos Ensayo: Sudan</b>	0.5 mL extracto en + V gotas de solución de colorante Sudán III y llevar a sequedad en baño de agua	Formación de una película de color roja
<b>Identificación de proteínas: Ensayo de Ninhidrina</b>	0.5 mL de extracto + 2 ml de solución de ninhidrina al 2% en agua y llevar a calentar por 5-10 minutos	Precipitación de color azul-violáceo.
<b>Identificación de Quinonas: Ensayo de Bornträger</b>	1 mL de extracto + 1 mL de Rvo. Bornträger + agitación	Coloración anaranjado-rojiza
<b>Identificación de catequinas: ensayo de catequinas</b>	En mancha residual se le asperezara solución de Carbonato de sodio 5%.	Verde carmelita a luz ultravioleta (UV).
<b>Identificación de Flavonoides: Ensayo de Shinoda</b>	2 mL de extracto + Mg metálico + HCl concentrado	Coloración amarilla a rojizo
<b>Identificación de Polifenoles Ensayo: Tricloruro férrico</b>	0.5 mL del extracto + 11 gotas de tricloruro Férrico al 5% en etanol.	Coloración azul-negruzca
<b>Identificación de Resinas Ensayo: de Resinas</b>	1 mL del extracto + adicionar 5 mL de agua destilada	Presencia de turbidez.
<b>Identificación de Taninos: Ensayo de Gelatina</b>	1 mL de extracto + 1 mL de agua + 1 gota de solución reactiva de gelatina.	Precipitado blanco

## Prueba de identificación fitoquímica II

Ensayo de identificación	Procedimiento	Indicador positivo
<b>Identificación de Alcaloides: Ensayo de Dragendorff, Ensayo de Mayer, Ensayo Wagner</b>	1 mL de extracto + 3 gotas de Rvo. Dragendorff 1 mL de extracto + 1 gota de HCl concentrado + calentamiento + NaCl /agitación y filtrado + 3 gotas de Rvo. de Mayer	Dragendorff: Precipitado rojizo Mayer: Precipitado blanquecino
<b>Identificación de Rosenhein: Ensayo de Leucoantocianidinas</b>	1 mL de extracto + 0.5 ml solución de ácido clorhídrico 2N/1-propanol llevar a ebullición de 15–30 minutos en baño de agua	Coloración roja en la fase acuosa.
<b>Identificación de Saponinas: Ensayo de Espuma</b>	1 mL de extracto + 2 mL de agua + agitación por 30 segundos	Espuma por 20 min. Aprox.
<b>Identificación de Mucilago: Ensayo de Mucilagos</b>	1 extracto en mL un tubo de ensayo y enfriar de 0-5°C	Cambio de la consistencia del extracto a gelatinoso.
<b>Identificación de Lactonas Ensayo de Baljet</b>	2 mL de extracto + 1 mL de Balajet	Coloración roja



### 2.4.1.3 Determinación de la actividad anti-tirosinasa <sup>(8)</sup>.

Se evaluó mediante el método cualitativo in vitro, por el ensayo de cromatografía en capa fina (CCF), se sembró en la fase estacionaria el estándar (ácido kojico), y las muestras del extracto etanólico del tegumento de dos variedades *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra (diluidas en DMSO), el revelado se realizó con soluciones de tirosinasa y tirosina <sup>(70)</sup>, donde se observaron manchas incoloras sobre un fondo gris-púrpura. Se usó la metodología de Wangthong et al. con ligeras modificaciones:

1. **Elaboración de Fase Móvil:** Se saturó la cámara cromatográfica con el sistema de solventes Metanol: Acetato de etilo (15:10 v/v)
2. **Elaboración de Fase Estacionaria:** Se activó 2 placas de sílica gel F<sub>254</sub> (Merck) de 15 x 10 cm.
3. **Preparación de soluciones:** Se preparó las soluciones de los extractos etanólico del tegumento de dos variedades *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña”, solución de estándar ácido kojico al 0,05 % (equivalente a 0,5 mg/mL) en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,8), solución de L-tirosina 1 M en buffer y solución de enzima Tirosinasa 1000 U/mL en buffer (se debe mantener a una temperatura de 2-8 °C).
4. **Siembra de la muestra:** Se depositó 100 uL de las soluciones del extracto y estándar por triplicado en el fondo de la placa de sílica gel F<sub>254</sub> (aproximadamente 1 cm desde el borde inferior)
5. **Desarrollo cromatográfico:** Se mantuvo por 5 minutos a temperatura ambiente, se colocó dentro de la cámara cromatográfica y se dejó eluir hasta 1 cm previo al borde superior de la placa. Al término de ascender la fase móvil se retiró la placa y se dejó secar a temperatura ambiente.
6. **Las manchas:** Se usó la lámpara UV/v a 365 nm observándose la separación de la fase estacionaria de color gris-púrpura.

7. **Efecto inhibitorio de la tirosinasa:** La enzima L-tirosinasa fue pre-incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se procedió a asperjar 2,5 mL sobre toda la placa e inmediatamente se asperjó la misma cantidad de solución L-tirosina sobre la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente. Las inhibiciones de la tirosinasa se observaron como la aparición de zonas incoloras sobre un fondo gris-violeta <sup>(8)</sup>.

#### **2.4.1.4 Acondicionamiento de los animales de experimentación**

Los animales de experimentación se adquirieron en el bioterio de la Universidad Cayetano Heredia, fueron alojados en jaulas metálicas dentro de las instalaciones del bioterio de la Universidad Norbert Wiener, para su adaptación por una semana previa a los experimentos, con libre acceso a agua y alimento; ambiente climatizado de  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura, con  $55 \pm 5$  % de humedad relativa.

#### **2.4.1.5 Elaboración del gel a base del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra.**

Se preparó una suspensión coloidal de Carbopol 940 al 1 % en agua destilada durante 24 horas para lograr una óptima hidratación, esta solución coloidal presenta un pH de 3, finalmente se añadió conservantes como la combinación Nipagin/Nipasol en proporción 2:1 (0,05% Nipagin + 0,01% Nipasol).

Lugo se procedió a la incorporación de los extractos secos del tegumento de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra en concentración de 2 y 5 %. Para la incorporación del extracto seco de ñuña roja al 2%, se pesó 0,6 g. de la muestra que se disolvió en IV gotas de propilenglicol y con la ayuda de una bagueta se incorporó en los 30 g de gel base, se agito hasta obtener una mezcla

homogénea (pH 6,5). Con este procedimiento se preparó los tratamientos ya mencionado.

#### **2.4.1.6 Implementación de sistema de irradiación UV-C**

Se implementó un sistema de irradiación UV-C, conformado por fluorescente de la marca Philips de 90 cm de longitud y 40 watts con un espectro de emisión de 100-280 nm con un pico de 253,7 nm, colocado en una cámara dimensiones fueron 70 x128 x 173 cm; cerrada herméticamente con una cubierta plástica de color negro para evitar la contaminación por radiación UVC <sup>(70)</sup>.

#### **2.4.1.6 Aplicación del tratamiento con la radiación UVC**

Se formó siete grupos de trabajo conformado por seis ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 por grupo: el grupo control (C-) sin gel, el grupo control (C) que se le aplicó sólo el vehículo cutáneo conformado por gel hidrofílico sin el extracto, el grupo control (C+) con un bloqueador comercial p/v y los grupos experimentales a los que se aplicará el extracto de las dos variedades de ñuña (roja y negra) a dos concentraciones diferentes: 2% y 5 % P/V.

Luego se aplicó a cada uno de los especímenes una dosis de 5 mg/cm<sup>2</sup> del gel con los tratamientos en la región dorsal rasurada 72 horas antes del ensayo. Después se sometió a la exposición de radiación UV-C, por un intervalo de 30 minutos, a una distancia de 30 cm, cinco días a la semana, durante un mes y una vez al día exceptuando que en el inicio del ensayo se evaluaron los siete primeros días.

**Tabla 7. Descripción de los tratamientos Fotoprotectores**

Descripción	Grupo Experimental	N
Grupo control sin gel	G0	6
Grupo control con gel hidrofílico	G-	6
Grupo control con bloqueador comercial	G+	6
Gel con el extracto etanólico de ñuña roja al 2%	G1 *Ñuña roja 2%	6
Gel con el extracto etanólico de ñuña roja al 5%	G2 *Ñuña roja 5%	6
Gel con el extracto etanólico de ñuña negra al 2%	G3 *Ñuña negra 2%	6
Gel con el extracto etanólico de ñuña negra al 5%	G4 *Ñuña negra 5%	6

\*Gel con el extracto etanólico

Adicionalmente, a los animales se les suministro una pequeña dosis de fenobarbital para sedarlos y evitar el movimiento del animal durante su exposición a la radiación UVC <sup>(71)</sup>.

#### **2.4.1.7 Prueba de Seguridad Farmacológica.**

Toxicidad dérmica del extracto etanólico del tegumento de dos variedades *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” en el lomo de las ratas cepa Holtzman.

Se usó la técnica de toxicidad dérmica modificada por Contero y Dehesa (2004), donde se depilo todo el pelo del dorso, y se esperó 24 horas para su siguiente procedimiento, para evitar irritación en la piel, al día siguiente, se pesaron y se marcó un cuadrante de 4cm x 4 cm en el dorso de cada rata con plumón indeleble, en esta zona se aplicó el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña”. Seguidamente, se administraron por única vez, el extracto diluido en agua por una dosis máxima de 5000 mg/kg, vía oral y tópicamente se aplicó el extracto total en una dosis 5000 mg/kg; sobre el cuadrante del dorso del animal; se cubrió con gasa y se selló con esparadrapo, para su completa penetración. Después de cuatro horas se retiró la gasa y se observaron a los animales de

experimentación (ratas) las horas restantes. Por 14 días fueron observados el 1<sup>er</sup> día, 7<sup>mo</sup> día y 14<sup>avo</sup> día, se pesaron las ratas para llevar a cabo los controles de sus pesos corporales <sup>(69)</sup>.

#### **2.4.1.8 Análisis Histológico**

Se usó pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg por vía intraperitoneal para extraer los órganos como: Piel, estómago, hígado, riñón y bazo; luego se procedió a envasar los tápers de plástico con formol al 10% para su respectivo estudio histológico.

Los tejidos se llevaron al Laboratorio Central de Patología Clínica del Hospital Nacional Arzobispo Loayza para su análisis histológico <sup>(72)</sup>.

#### **2.4.1.9 Instrumentos**

Escala de valorización de las lesiones eritematosas y edematosas en piel según el grado de severidad de daño cutáneo, basada en sistema de Draize (OECD, 2000) <sup>(71)</sup>.

**Tabla 8. Escala de daño cutáneo de DRAZE <sup>(71)</sup>.**

Formación de Eritema	Grado
No eritema	0
Ligero eritema escasamente perceptible	1
Moderado eritema	2
Severo eritema	3
Lesión severa con quemaduras	4

Formación de Edema	Grado
No edema	0
Edema muy ligero	1
Ligero edema	2
Moderado edema	3
Severo edema	4

Escala de valorización para determinar tipo de foto envejecimiento basado en clasificación de Glogau modificado (Fisher, 2005)<sup>(71)</sup>.

**Tabla 9. Tipo de foto envejecimiento según GOGLAU <sup>(71)</sup>.**

<b>Tipo I: Sin arrugas</b>	<b>Tipo II: "Arrugas con el movimiento"</b>
Foto envejecimiento precoz sin queratosis mínimas arrugas Sin cicatrices	Foto envejecimiento de precoz a moderado  Lentigo senil precoz visible Queratosis actínica precoz Leves señales de cicatrices
<b>Tipo III: "Arrugas en reposo"</b>	<b>Tipo IV: " Sólo arrugas"</b>
Foto envejecimiento avanzado Discromía y telangiectasia obvias Queratosis visible Neoplasias (+) Arrugas incluso cuando se mueve	Foto envejecimiento intenso  Piel amarillo-grisácea Neoplasias cutáneas (+++) Toda la piel arrugada, sin piel normal

## **2.5. Procedimiento para recolección de datos**

Los valores de cada caso fueron recolectados según los instrumentos de evaluación de acuerdo con el modelo experimental planteados a partir de las unidades experimentales.

## **2.6. Análisis estadístico de datos**

Los datos obtenidos en el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Ñuña roja y negra en ratones cepa Balb/C53 fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) empleando el programa SPSS VERSIÓN 24 a un nivel de confianza de  $p < 0,05$ .

## **2.7. Aspectos éticos**

Los animales de experimentación (ratones y ratas) fueron tratados apropiadamente siguiendo las directrices del manual de manejo de animales experimentales del Instituto Nacional de Salud del Perú. “Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón” (INS, 2008).

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Estudio fitoquímico cualitativo de los metabolitos presentes en el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra.

En el estudio fitoquímico cualitativo se identificó la presencia de: Azúcares reductores, esteroides, lípidos, quinonas, catequinas, flavonoides, polifenoles, taninos, alcaloides, leucoantocianidinas, mucilagos, lactonas y observándose la ausencia de saponinas esteroidales y grupo amino libre en el extracto de las dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. ñuña roja y ñuña negra.

**Tabla 10. Resultados del estudio preliminar del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra.**

Ensayo	Metabolitos identificados	Ñuña roja	Ñuña negra
Fehling A y B	Azúcares reductores	+	+
Liebermann-Burchard	Esteroides	-	+
Ensayo de Sudán	Lípidos	+	+
Ninhidrina	Proteínas	-	-
Ensayo de Bortranger	Quinonas	+	+
Ensayo de Catequinas	Catequinas	-	+
Shinoda	Flavonoides	+	+
Tricloruro férrico	Polifenoles	+	+
Ensayo de resinas	Resinas	+	-
Ensayo de Gelatina	Taninos	-	+
Ensayo de Dragendorff	Alcaloides	+	+
Mayer	Alcaloides	+	+
Wagner	Alcaloides	+	+
Ensayo de Rosenhein	Leucoantocianidinas	+	+
Ensayo de Espuma	Saponinas esteroidales	-	-
Ensayo de Mucilagos	Mucilagos	+	+
Baljet	Lactonas	+	+

Leyenda: (+) Presencia, (-) Ausencia

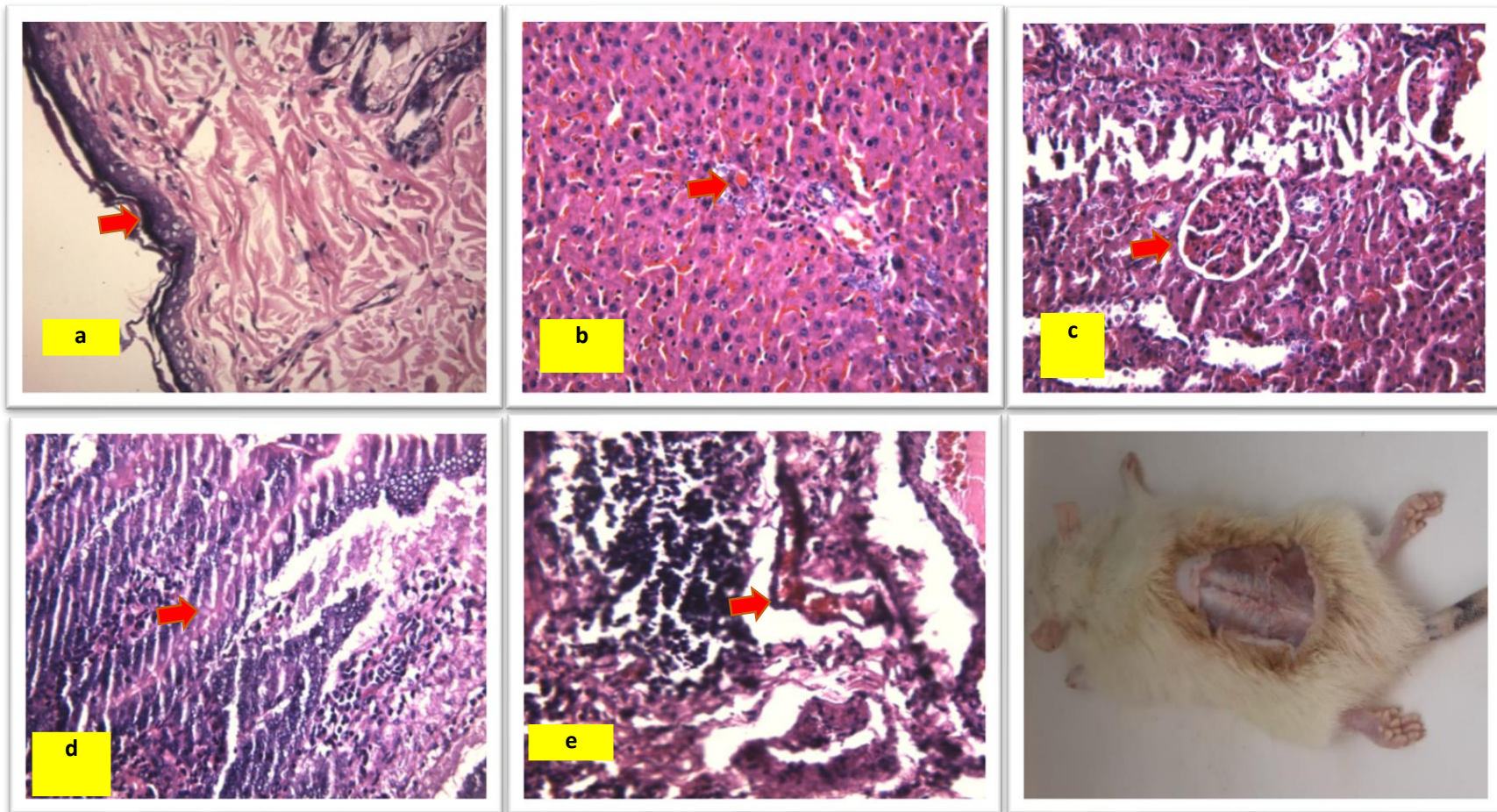


**3.2 Toxicidad aguda a dosis límite de 5000 mg/kg en las ratas de cepa Holtzman del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra, por vía oral y dérmica a dosis única <sup>(72)</sup>.**

Se administró una dosis única y evaluó a los animales de experimentación (rata) durante dos semanas, sin presentar signos visibles de intoxicación, por lo que se procedió al análisis histopatológico de la piel, hígado, estómago, riñón y pulmón en 3 grupos: Control (sin ñuña), ñuña roja y ñuña negra (Tabla 11). Se encontró que la sustancia en cuestión es “prácticamente no tóxico” según la escala de Trevan al no encontrarse especímenes muertos a esta concentración y los daños fueron leves a nivel de los órganos evaluados (Figuras 1,2 y 3).

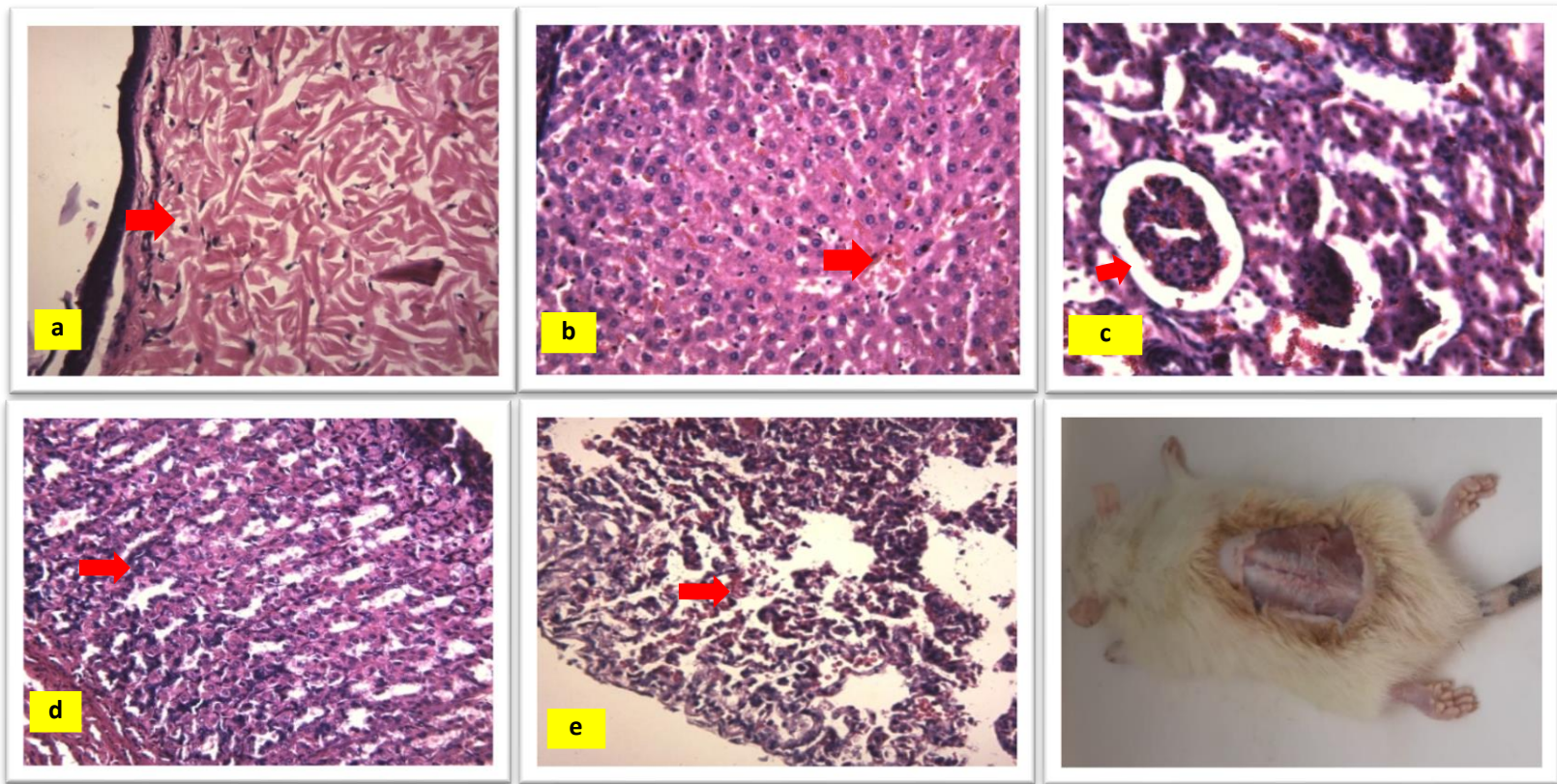
**Tabla 11. Análisis histopatológico de órganos de ratones sometidos a una dosis aguda de extracto de tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña”.**

Grupo	Piel	Hígado	Riñón	Estómago	Pulmón
Control	Piel conservada sin signos de toxicidad	Presenta congestión, pero no se aprecia toxicidad	Se aprecian glomérulos con bajo grado de congestión	No se observan lesiones en las glándulas de las mucosas	No presenta toxicidad
Ñuña roja	Características histopatológicas normales	Presencia de eritrocitos sin daño de hepatocitos	Glomérulos congestionados	Leve inflamación en las glándulas mucosas	Presencia de eritrocitos y lesiones leves
Ñuña negra	Piel gruesa con aumento de colágeno y folículo piloso	Presencia de eritrocitos en mayor cantidad y congestión de Hepatocitos	Glomérulos con bajo grado de congestión y presencia de eritrocitos	Presencia de eritrocitos y lesiones en las glándulas mucosas	Presencia de eritrocitos y lesiones leves



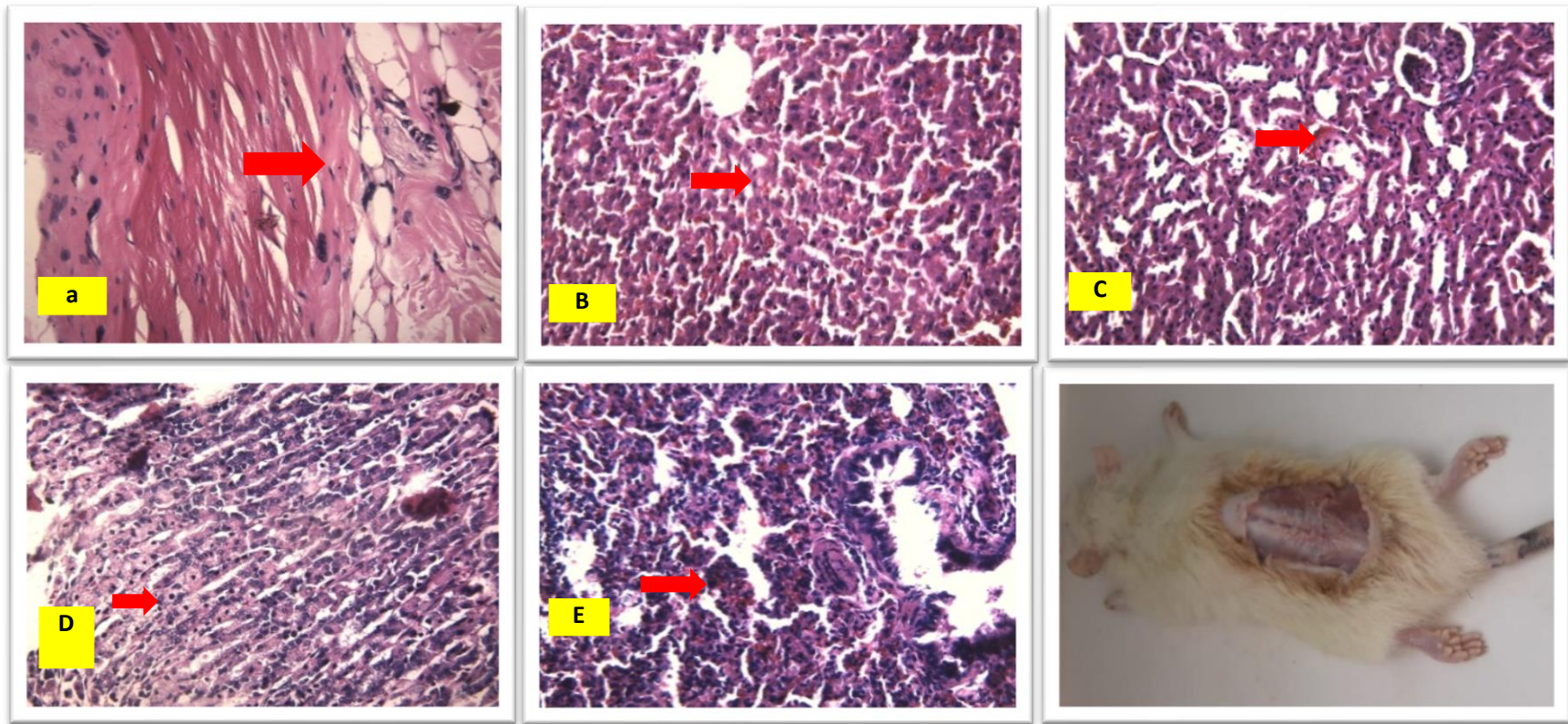
**Figura 1. Análisis histopatológicos del grupo control**

En la Figura 1 se observa: (a) Piel conservada sin signos de toxicidad. (b) Hígado presenta congestión y no se aprecia toxicidad. (c) Riñón se aprecian los glomérulos con bajo grado de congestión. (d) Estómago no se observan lesiones en las glándulas de las mucosas. (e) Pulmón no presenta toxicidad.



**Figura 2. Análisis Histopatológicos del grupo con el tratamiento de Nuña Roja**

En la Figura 2 se observa: (a) Piel con las características histopatológicas normales. (b) Hígado se observa presencia de eritrocitos y no se aprecia daño a nivel de los hepatocitos. (c) Riñón se observa presencia de glomerulos congestionados. (d) Estómago presenta leve inflamación en las glándulas de las mucosas. (e) Pulmón, se observa presencia de eritrocitos y lesiones leves.

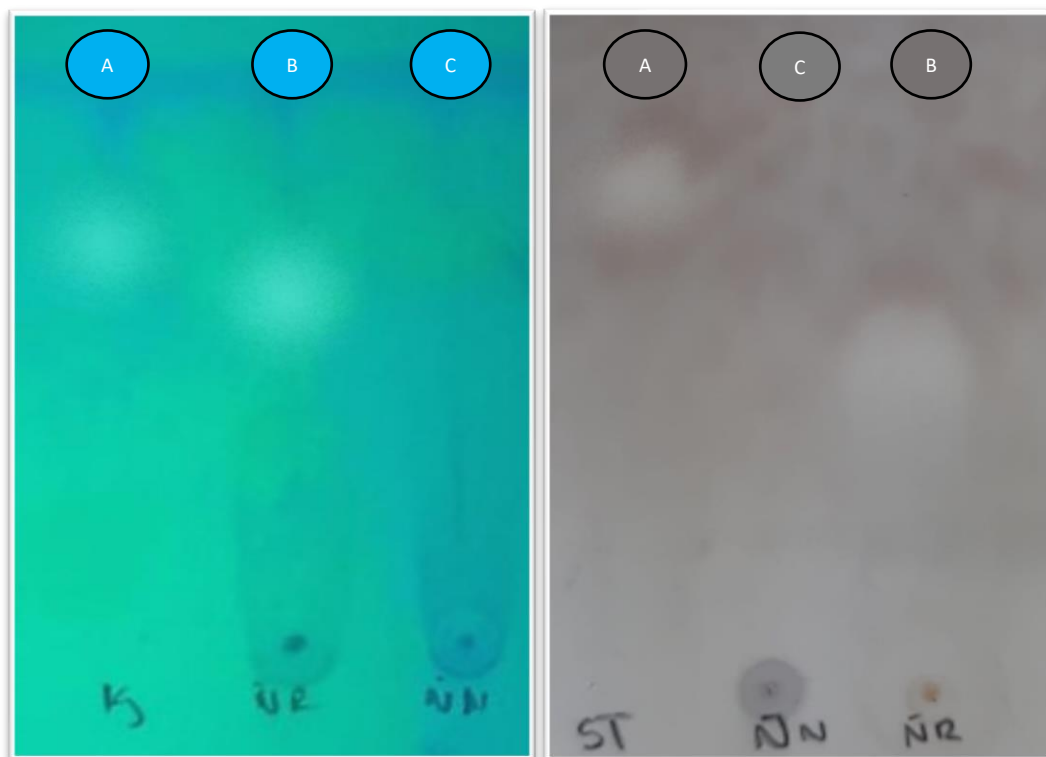


**Figura 3. Análisis Histopatológicos grupo con el tratamiento de Nuña Negra**

En la Figura 3 se observa: (a) Piel gruesa con presencia de aumento de colágeno y folículo piloso. (b) Hígado se observa presencia de eritrocitos en mayor cantidad, congestión a nivel de los hepatocitos. (c) Riñón se aprecian los glomérulos con bajo grado de congestión y presencia de eritrocitos. (d) Estómago se observa presencia de eritrocitos y lesiones en las glándulas de las mucosas. (e) Pulmón se observa presencia de eritrocitos.

### 3.3 Actividad anti-tirosinasa del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra por cromatografía en capa fina <sup>(8)</sup>.

Se evaluó la actividad anti-tirosinasa en forma cualitativa mediante cromatografía de capa fina (Figura.4). La inhibición de la tirosinasa se observó como la aparición de zonas incoloras sobre un fondo gris-violeta de la placa. Se observaron zonas incoloras en el estándar de ácido kojico (inhibición del efecto de la tirosinasa), de igual forma con el extracto etanólico ñuña roja y no muy clara en el extracto etanólico de ñuña negra; lo cual nos indica que el extracto etanólico de ñuña roja tiene capacidad anti-tirosinasa <sup>(8)</sup>.



**Figura 4. Actividad anti-tirosinasa de los extractos de *Phaseolus vulgaris* L. ñuña roja y negra en cromatografía de capa fina**

Leyenda: A (ácido kojico) B (Extracto etanólico ñuña Roja) C (Extracto etanólico ñuña Negra) en placa cromatográfica en luz visible al ambiente completa (decoloraciones sobre fondo oscuro) y a 366 nm (luz UV).

### 3.4 Efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra en ratones cepa Balb/C53 expuestos a radiación UVC.

Se evaluó el efecto fotoprotector a los 7 y 30 días respectivamente en ratones cepa Balb/C53 expuestos a radiación UVC y bajo la acción de los grupos experimentales consistentes en geles a base de distintas concentraciones del extracto del tegumento de ñuña de los tipos roja y negra, los resultados en función de los grados de eritema, edema y fotoenvejecimiento que componen las variables relacionadas al efecto fotoprotector se describen a continuación.

#### 3.4.1. Efecto fotoprotector a los 7 días

A los siete días de la exposición a la radiación UV, los grupos de tratamientos con extractos de ñuña negra (2 y 5%) y de ñuña roja al 5% presentaron menor grado de eritema y edema en comparación al grupo control (bloqueador comercial); respecto al fotoenvejecimiento, el extracto de ñuña negra presentó menor grado en similitud estadística con el grupo control (bloqueador comercial) (Tabla 12, Figura 6, 7, 8 y 9).

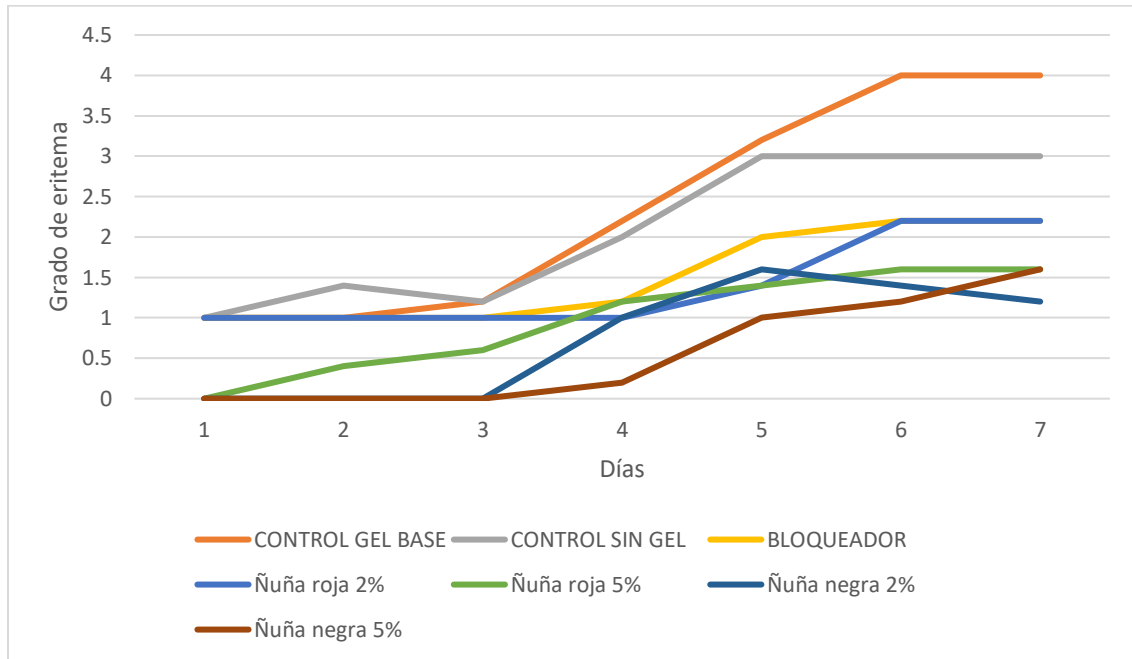
**Tabla 12. Efecto fotoprotector de los extractos de ñuña roja y ñuña negra a los siete días**

Grupo	Grado de eritema	Grado de edema	Grado de Fotoenvejecimiento
Bloqueador	2 b	2 b	1 a
Control gel base	4 d	4 d	3 c
Control sin gel	3 c	3 c	3 c
Ñuña negra 2%	1 a	1 a	2 b
Ñuña negra 5%	1 a	1 a	1 a
Ñuña roja 2%	2 b	2 b	2 b
Ñuña roja 5%	1 a	1 a	2 b

\* A partir del promedio de 5 repeticiones, letras iguales asocian a tratamientos estadísticamente similares según la prueba de Mann Whitney.

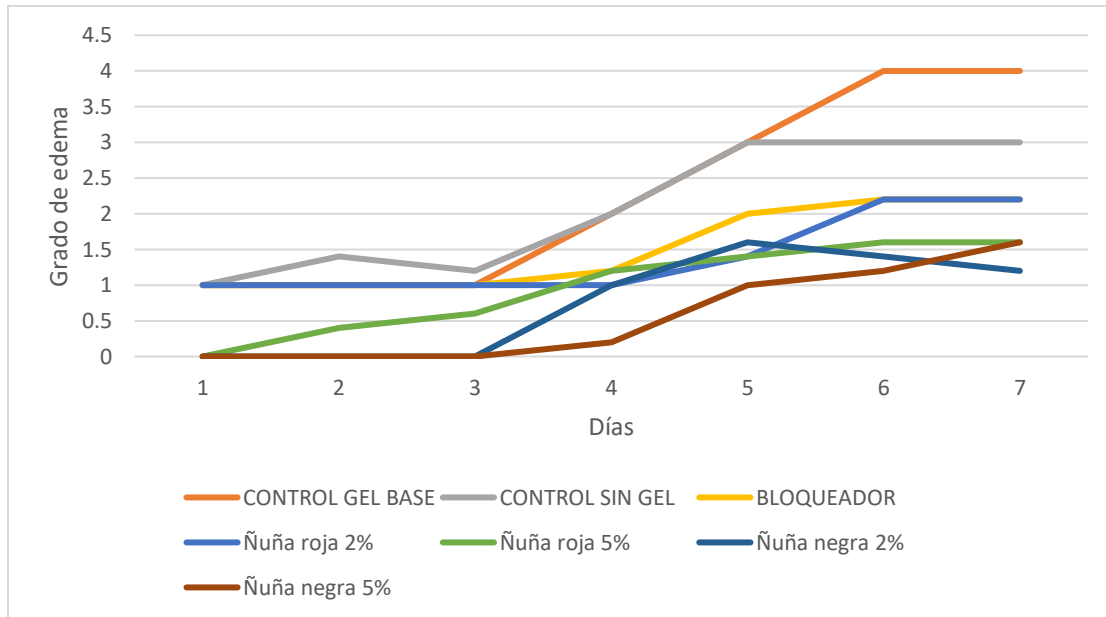
Los grados de eritema y edema, también se evaluaron diariamente durante los siete días, las evoluciones de los mismos se muestran en las Figura 5 y 6 en las que

destaca que el tratamiento con ñuña negra al 5% no sólo muestra menor grado de los mismos, sino que retrasa la aparición del fotodaño.



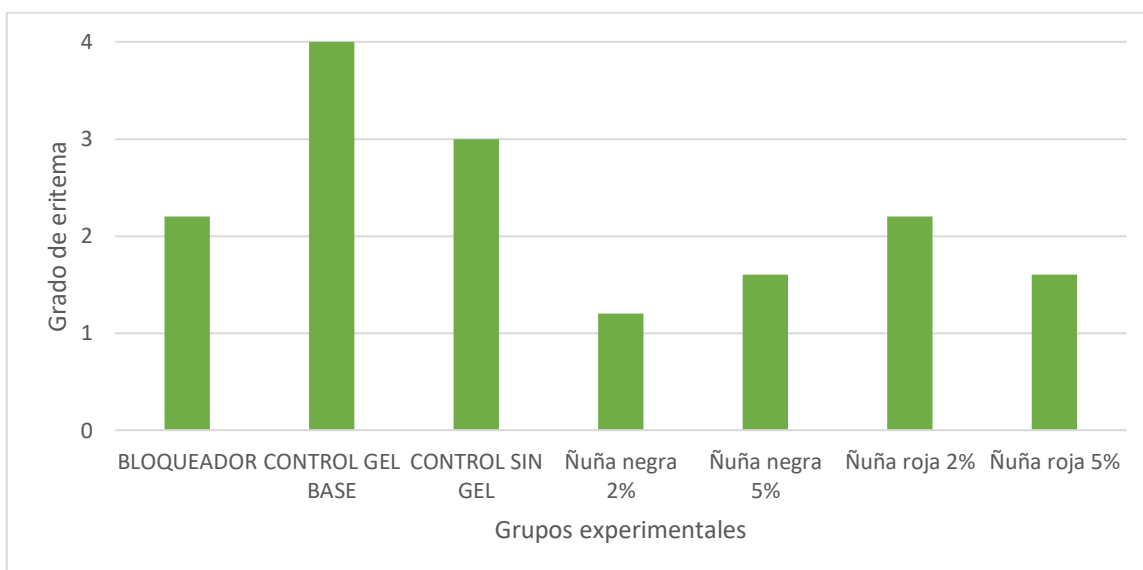
**Figura 5. Evolución del grado de eritema en siete días por grupo experimental**

En la figura 5. Se observa que los grados de eritema, se evaluaron diariamente durante los siete días, en las que destaca que el tratamiento con el extracto del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad ñuña negra al 5% no sólo muestra menor grado de los mismos, sino que retrasa la aparición del fotodaño.



**Figura 6. Evolución del grado de edema en siete días por grupo experimental**

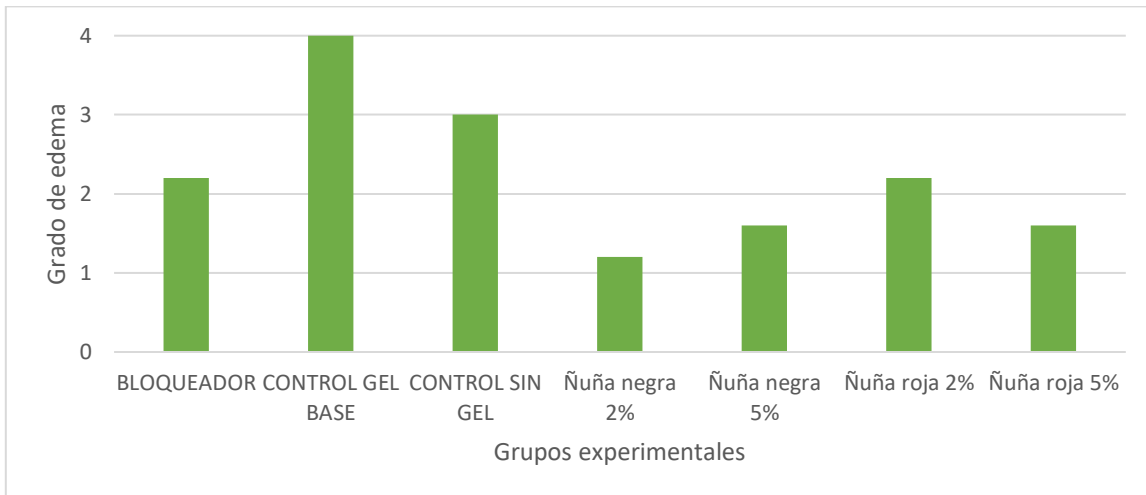
En la figura 6 muestras que los grados de edema, se evaluaron diariamente durante los siete días, en las que destaca que el tratamiento con extractos del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad ñuña negra (2 y 5%) y ñuña roja al 5% presentan menor grado de edema y que además la ñuña negra al 5% no sólo muestra menor grado de los mismos, sino que retrasa la aparición del fotodaño.



**Figura 7. Grado de eritema a los siete días por grupo experimental**

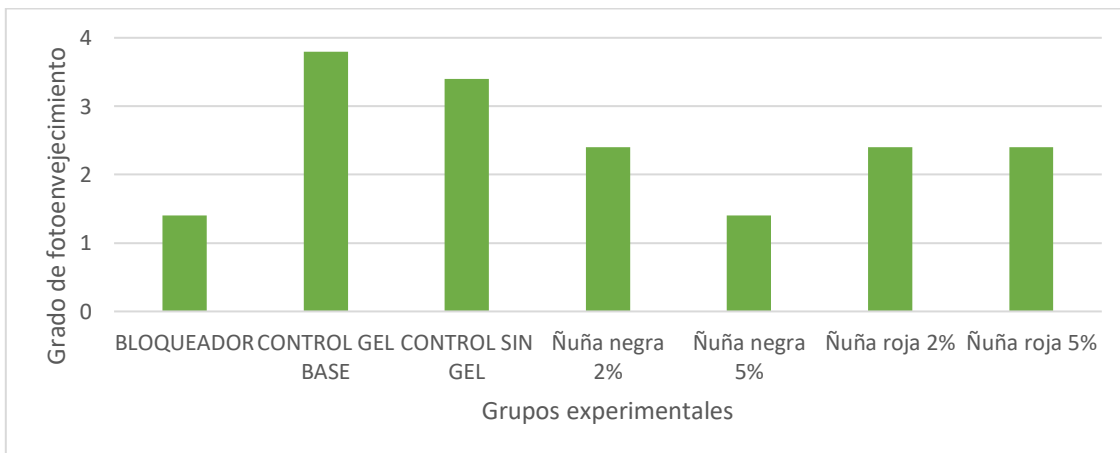


En la figura 7 se observa a los siete días de la exposición a la radiación UV y de la aplicación de los tratamientos se encontró que extractos del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad ñuña negra (2 y 5%) y de ñuña roja al 5% presentaron menor grado de eritema incluso comparado con el grupo control al que se le aplicó un bloqueador comercial.



**Figura 8. Grado de edema a los siete días por grupo experimental**

En la Figura 8 se observa a los siete días de la exposición a la radiación UV y de la aplicación de los tratamientos se encontró que los extractos del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad ñuña negra (2 y 5%) y de ñuña roja al 5% presentaron menor grado de edema incluso comparado con el grupo control al que se le aplicó bloqueador comercial.



**Figura 9. Grado de foto envejecimiento a los treinta días por grupo experimental**

En la Figura 9 a los treinta días de la exposición a la radiación UV y de la aplicación de los tratamientos se encontró a nivel histopatológico que el extracto del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad ñuña negra presentó menor grado en similitud estadística con el grupo control, incluso comparado con el grupo control al que se le aplicó bloqueador comercial.

En la vista macroscópica durante los siete días, mostraron que los grados de eritema y edema que los extractos del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad ñuña negra (2 y 5%) y ñuña roja al 5 % presentan menor grado de edema y eritema, y que además la ñuña negra al 5% no sólo muestra menor grado de los mismos, sino que retrasa la aparición del fotodaño (Figura 17).

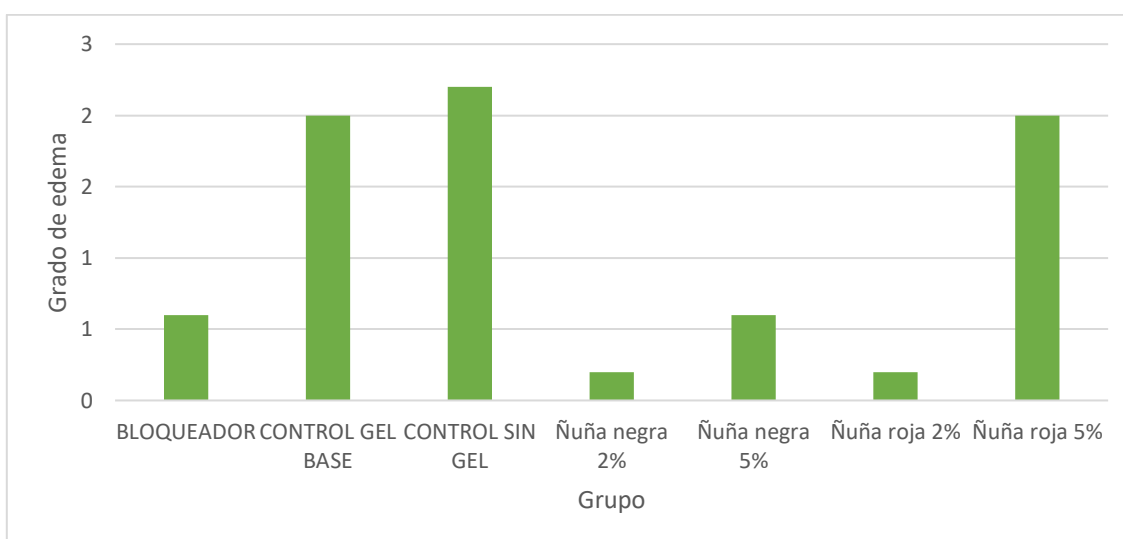
#### **3.4.1. Efecto fotoprotector a los 30 días**

Se analizaron los grados de eritema, edema y fotoenvejecimiento en los ratones expuestos a la radiación UVC (treinta minutos por día durante un mes) y tratados con un gel a base de ñuña negra y ñuña roja a dos concentraciones (2 y 5%) respectivamente y controles (gel base, sin gel y bloqueador). Se encontró un grado de eritema igual a cero en todos los grupos experimentales que por lo tanto no fue sometido al análisis estadístico. Para los grados de edema y fotoenvejecimiento (Tabla 11), se encontró que en el caso de edema los extractos de ñuña negra fueron igual de eficientes que el bloqueador; mientras que en el caso de fotoenvejecimiento en este periodo tan prolongado de 30 días sólo los extractos al 5% de ambas variedades de ñuña resultaron en un menor grado, incluso menor que el tratamiento con bloqueador (Figura 12, 13 y 14).

**Tabla 13. Grados de edema y fotoenvejecimiento del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra en ratones Balb/C53 inducidos por radiación.**

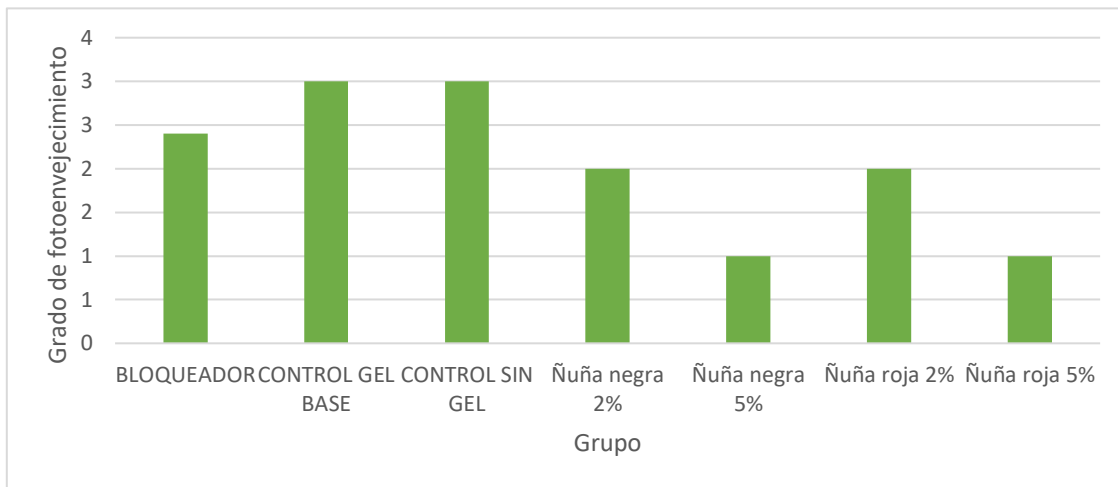
Grupo	Grado de Edema *	Grado de Fotoenvejecimiento *
Bloqueador	0.6 a	2.4 c
Control gel base	2.0 b	3.0 d
Control sin gel	2.2 b	3.0 d
Ñuña negra 2%	0.2 a	2.0 b
Ñuña negra 5%	0.6 a	1.0 a
Ñuña roja 2%	0.2 a	2.0 b
Ñuña roja 5%	2.0 b	1.0 a

\* A partir del promedio de 5 repeticiones, letras iguales asocian a tratamientos estadísticamente similares según la prueba de Mann Whittney



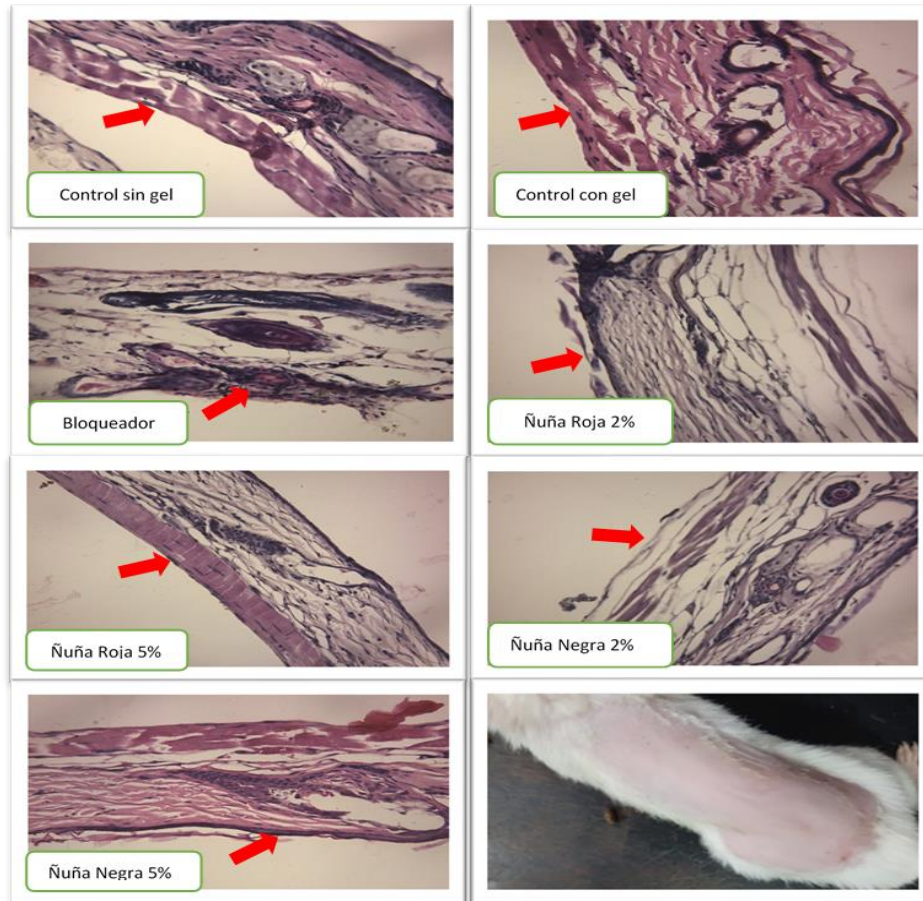
**Figura 100. Grados de edema en la piel de ratones cepa Balb/C53 tratados con el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra expuestos a radiación UVC.**

En la figura 10 se evidencio que el grado de edema en el grupo experimental con el el extracto etanólico del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. variedad ñuña negra fueron igual de eficientes que con el grupo control (bloqueador comercial).



**Figura 111. Grados de fotoenvejecimiento en la piel de ratones cepa Balb/C53 tratados con el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra expuestos a radiación UVC.**

En la figura 11 se evidencio que el grado de fotoenvejecimiento en el grupo experimental con el el extracto etanólico del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. en ambas variedades de ñuña al 5 % resultaron incluso menor que el tratamiento con el grupo control (bloqueador comercial)



**Figura 12. Vista microscópica del fotodaño en ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 según grupo experimental en cortes**

En la figura 12 se observó microscópicamente el fotodaño en los especímenes *Mus musculus* Balb/C53 de todo el grupo experimental. En el grupo control sin gel, la piel presentó edema grado 3 y paraqueratosis; en el grupo tratado con el bloqueador comercial se evidenció ligero edema; En los grupos de tratamiento con el extracto etanólico del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. ñuña roja y negra 2 y 5% se observaron ligero edema y además presenta hiperactividad del folículo piloso por lo que se observa presencia de pelo, esta es una reacción no esperada respecto a su efecto promotor de crecimiento del pelo, en general el extracto de ñuña variedad roja y negra presentaron efecto fotoprotector sobre la radiación UVC.

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Discusiones

Dentro de los metabolitos secundarios presentes en diversas plantas, los compuestos polifenólicos como los encontrados en la ñuña (Tabla 8) presentan actividad antioxidante los cuales contrarrestan los efectos nocivos del estrés oxidativo, el cual es fuente de varios problemas a nivel celular, entre ellos el daño asociado a la radiación UV <sup>(73)</sup> <sup>(74)</sup>. Los polifenoles no fueron los únicos compuestos evidenciados en el tegumento de ñuña, se encontraron otros como flavonoides, taninos, alcaloides mediante ensayos de coloración y precipitado como lo describe Olga Lock de Ugaz en su obra Investigación fitoquímica <sup>(75)</sup>, que concuerdan con análisis cualitativos en otros frijoles como lo reporta Vargas y Villamil en harina de frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L.), que como los autores sugieren que puede utilizarse para el tratamiento de desórdenes fisiológicos, para prevenir el daño celular por acción oxidante y protegiendo a las células de la carcinogénesis<sup>(76)</sup> <sup>(77)</sup>.

Hernández et al. Menciona que depende de cada variedad de ñuña (testa roja y testa negra) y del solvente que se emplea, se obtendrán los diferentes metabolitos; como en el caso del extracto etanólico encontró esteroides o triterpenos y grupo amino libres, por otro lado, en el extracto acuoso se evidenciaron la presencia de taninos, alcaloides, fenoles y azúcares reductores <sup>(78)</sup>.

De todos estos compuestos los más activos y abundantes parecen ser los polifenoles como lo sugiere García Díaz que en su investigación cuantificó los compuestos fenólicos encontrando diferencias estadísticas significativas entre las variedades. Los mayores contenidos de fenoles los cuantificaron en la variedad de testa negra, seguida por la roja, con diferencias estadísticas entre ellas, y en menor cuantía la variedad de testa blanca <sup>(79)</sup>; por lo que resultados encontrados al realizar el análisis

cualitativo fitoquímico preliminar, guardan cierta similitud con los metabolitos secundarios encontrados por los autores mencionados anteriormente.

En este estudio se evaluó la actividad anti-tirosinasa y, según los resultados, los extractos etanólicos de *Phaseolus vulgaris* L. de la ñuña presentaron capacidad inhibitoria de la enzima tirosinasa en un revelado por cromatografía de capa fina. En la actualidad se conoce que el estímulo más importante para la melanogénesis es la radiación ultravioleta <sup>(80)</sup> y que los polifenoles afectan la biosíntesis de la melanina <sup>(81)</sup>.

Al respecto, Agustín A. y Col., mencionan que esta metodología cromatográfica permite identificar componentes activos y es un método adecuado para nuestros fines analíticos para demostrar de forma cualitativa la actividad inhibitoria de la tirosinasa de los extractos vegetales estudiados <sup>(82)</sup>; mientras que Kim, Y.-J. y Uyama H. respecto a los polifenoles afirman que dentro de sus propiedades, una de ellas es la actividad inhibitoria de la tirosinasa y uno de los mecanismos es inhibir competitivamente a la tirosinasa por su capacidad de quelar el cobre en el sitio activo, lo que lleva a la inactivación irreversible de tirosinasa <sup>(83)</sup>. En este estudio se utilizó la técnica de determinación cualitativas y de variaciones de cromatografía en capa fina (CCF) para la evaluar la actividad anti-tirosinasa, donde se aspersó la solución de enzima tirosinasa y sustrato L-tirosina sobre una placa que contenía las posibles soluciones inhibitoras (extracto etanólico de la testa roja y testa negra) junto al inhibidor comprobado (estándar de ácido Kójico) de esta forma las moléculas del inhibidor presentes en la placa se unieron a la enzima formando el complejo enzima-inhibidor, observándose zonas incoloras en un fondo gris-violeta (área con presencia del inhibidor) evidenciándose que los extractos etanólicos de la testa de la ñuña roja y negra tienen la capacidad inhibitoria en un revelado por cromatografía de capa fina.

Las diversas alteraciones cutáneas incluidas el cáncer de la piel son causados por la sobreexposición a la radiación solar particularmente al componente ultravioleta (UV) <sup>(84)</sup>. La radiación emite tres tipos de radiación ultravioleta UVC; UVB; UVA <sup>(85)</sup>.

La radiación ultravioleta UVB constituye al rededor del 5% de la radiación UV <sup>(86)</sup>, se conoce que es el componente más activo de la radiación solar, responsable de una gran variedad de enfermedades de la piel, incluyendo el cáncer de piel melanómico y no melanómico, actúa principalmente en la capa basal de la epidermis induciendo daño en el ADN, estrés oxidativo, envejecimiento prematuro de la piel y puede actuar como iniciador de tumor y Co-carcinógeno <sup>(87)</sup>.

Por otro lado, la radiación ultravioleta UVA constituye entre el 90 y 95% de la radiación solar que llega a la superficie de la tierra y debido a su longitud de onda más amplia, tiene alta capacidad de penetración en la piel, esto conlleva a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que puede causar daño a nivel de las proteínas celulares, lípidos y ADN <sup>(88)</sup>. Tanto las radiaciones ultravioletas UVB y UVA son las responsables hasta del 90 % de los cambios comúnmente atribuibles al envejecimiento <sup>(89)</sup>.

En los resultados obtenidos se evidenciaron que los extractos de ñuña negra (2 y 5%) y de ñuña roja al 5 % presentaron menor grado de eritema y edema; con respecto al fotoenvejecimiento, el extracto de ñuña negra presentó menor grado de similitud estadística con el grupo control. Los grados de eritema y edema también fueron evaluados diariamente durante siete días, en la que destaca que el tratamiento con ñuña negra al 5% no solo demuestra menor grado de los mismos, sino que retrasa la aparición del fotodaño.

Los resultados encontrados concuerdan con Seijas (2010) <sup>(7)</sup>, quien evaluó el efecto fotoprotector del extracto antociánico de *Zea mays* "maíz morado" donde evaluó el fotodaño agudo, subagudo y fotoenvejecimiento inducido



por radiación UVC, encontrando que el extracto de " maíz morado", que es rico en polifenoles, posee efecto fotoprotector ante la actividad dañina de la radiación UVC.

Al igual que Tarquino (2018) <sup>(8)</sup> que valoró *in vitro* la actividad fotoprotectora de extractos fenólicos a partir de 4 variedades de quinua en la cual determinó que la variedad de quinua QA, mostro tener contenido mayoritario de compuestos fenólicos que absorben en el rango de radiación UVA y UVB <sup>(8)</sup>.

En los resultados también se evidenció cierto daño en el grupo que se aplicó la crema estándar libre de extracto de ñuña, ello puede justificarse según Ishiwatari y *Col*, que mencionan que los conservantes como metilparabeno y propilparabeno intervienen en la fisiología de la piel inhibiendo la producción de hialurónico y colágeno tipo V estas se encuentran en la capa basal de la piel proporcionando hidratación, proliferación y diferenciación de la epidermis cutáneo al disminuir su producción se produce el deterioro y envejecimiento de la piel en este estudio se observó que el mecanismo de estos conservantes es acumularse sobre de epidermis afectando a los queratinocitos desencadenando una serie de modificaciones desfavorables sobre la piel <sup>(90)</sup>.

Los investigadores, Osamu et al. Manifiestan que en el estudio: "El metilparabeno potencia el daño inducido por los rayos UV de los queratinocitos de la piel", determinaron que el metilparabeno puede presentar efectos nocivos en la piel en concentraciones 0,3% y puede presentar un sinergismo de toxicidad ya que la radiación desencadena una serie de reacciones bioquímicas desfavorables para la piel <sup>(91)</sup>, por lo que se evidencio en el estudio el grupo que solo contenía gel base presento edema, eritema y fotodaño a diferencia de los otros grupos.

## 4.2. Conclusiones

- El análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra demostró la presencia de: Quinonas, flavonoides, taninos, azúcares reductores, resinas, compuestos fenólicos, lípidos, alcaloides, cumarinas, leucoantocianidinas, saponinas esteroidales y polisacáridos.
- El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra es prácticamente no tóxico en ratas Holtzman por vía oral y dérmica a dosis límite de 5000 mg/kg.
- El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” roja y negra a nivel cualitativo evaluado por cromatografía en capa fina se observó decoloraciones sobre el fondo gris oscuro evidenciando resultados inhibitorios positivos en las dos muestras de ñuña similar al del ácido Kójico.
- El extracto etanólico del tegumento de *Phaseolus vulgaris* L. “ñuña” aplicado en gel al 5%, en mayor grado la variedad negra y en menor grado la variedad roja, presentó efecto fotoprotector en ratones de la especie *Mus musculus cepa* Balb/C53 sometidos a la radiación UVC, disminuyendo el grado de edema, eritema y fotoenvejecimiento.

### 4.3. Recomendaciones

- Se recomienda emplear el tegumento de ñuña negra en el desarrollo de un protector solar debido a su efecto fotoprotector y toxicidad casi nula según los resultados encontrados en la presente investigación.
- Se recomienda estudiar el potencial efecto promotor del crecimiento capilar y el aumento de colágeno sobre la piel encontrado en el análisis histopatológico y observado a nivel macroscópico en los ratones de la especie *Mus musculus cepa Balb/C53*.

## CITAS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arellano I, Alcalá D, Barba JF, Carlos B, Castanedo JP, Barreda F, et al. Recomendaciones clínicas para la fotoprotección en México. *Dermatología CMQ*. [Internet].2014 [citado 18 de septiembre de 2019]; 12 (4): 243–55. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm144e.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Organización, Salud Programa, Mundial Unidas, Naciones Comisión, Medio Ambiente Índice UV solar mundial. UV Index [Internet]. 2003; Available from: <http://www.who.int/uv>
3. Díaz E, Castillo M, Sabates M, Curbelo M, Ramos N. Radiación Ultravioleta. Fotoenvejecimiento cutáneo. *MediSur*. [Internet]. 2005 [citado 18 de septiembre de 2019]; 3 (1): 14–33. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180020172002>
4. Doroteo V, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* de 6 plantas peruanas. *Rev. Soc. Quím. Perú* [Internet]. 2013 [citado 18 de septiembre de 2019]; 79(1): 13 – 20. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n1/a03v79n1.pdf>
5. Moya T, Osorio R. Actividad fotoprotectora de formulación tópica a base del extracto hidroalcohólico de *Fragaria vesca* L. (fresa). [tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico] [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017 [citado 19 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6878>

6. Parveen N, Ayesha S, Sharique A. On the Intricacies of Facial Hyperpigmentation and the Use of Herbal Ingredients as a Boon for Its Treatment: Cosmeceutical Significance, Current Challenges and Future Perspectives. *Science*. 2019. Disponible en DOI: 10.5772 / intechopen.84257.
7. Tohme J, Toro O, Vargas J, Debouck DG. Variability in Andean Nuña Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*, Fabacea). *Econ Bot.* [Internet]. 1995[citado 19 de septiembre de 2019]; 49(1): 78-95. Disponible en: <https://www.academia.edu/8777312>
8. Centro Nacional de Comunicaciones Biomédicas Lister Hill. Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. Guía para entender Condiciones genéticas. Genetics Home Reference. [Internet]. 21 de enero 2020 [citado 12 de febrero del 2020]; Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TYR>
9. Masum M, Yamauchi K, Mitsunaga T. Tyrosinase inhibitors from Natural and Synthetic Sources as Skin- lightening Agents. *Reviews in Agricultural Science*. [citado 12 de febrero del 2020]; 7: 41 – 58. Disponible en: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/ras/7/0/7\\_41/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ras/7/0/7_41/_article/-char/ja/)
10. Sulaimon S, Kitchell B. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol*. 2003, 14, 57–65.
11. Nawas A, Shafi T, Khaliq A, Mukhtar H. Tyrosinase: Sources, Structure and Applications. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*. [Internet]. 2017 [citado 12 de febrero del 2020]; 3 (5): 142 – 148. Disponible en: <https://biocoreopen.org/ijbb/Tyrosinase-Sources-Structure-and-Applications.php>

12. Zolghadri S, Bahrami A, Hassan M, Muñoz J, Garcia F, Saboury A. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. [Internet]. 2019 [citado 12 de febrero del 2020]; 34 (1): 279-309. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6327992/>
13. Tief K, Hahne M, Schmidt A, Beermann F. Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain. *Eur. J. Biochem.* [Internet]. 1996 [citado 12 de febrero del 2020]; 241: 12 – 16. Disponible en: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.1996.0012t.x>
14. Tahany A, Khalil N, Mohamed A, Enas Y. Purification, characterization and medicinal application of tyrosinase extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*. [Internet]. 2019 [citado 12 de febrero del 2020]; 6(1): 1- 11. Disponible en: [http://www.jipbs.com/VolumeArticles/FullTextPDF/437\\_JIPBSV6I101N1.pdf](http://www.jipbs.com/VolumeArticles/FullTextPDF/437_JIPBSV6I101N1.pdf)
15. Panzella L, Napolitano A. Natural and Bioinspired Phenolic Compounds as Tyrosinase Inhibitors for the Treatment of Skin Hyperpigmentation: Recent Advances. *Cosmetics*. [Internet]. 2019 [citado 12 de febrero del 2020]; 6(57):1-33. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/336201520> Natural and Bioinspired Phenolic Compounds as Tyrosinase Inhibitors for the Treatment of Skin Hyperpigmentation Recent Advance.

16. Tahany A, Khalil N, Mohamed A, Enas Y. Purification, characterization and medicinal application of tyrosinase extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*. [Internet]. 2019 [citado 12 de febrero del 2020]; 6(1): 1- 11. Disponible en: [http://www.jipbs.com/VolumeArticles/FullTextPDF/437\\_JIPBSV6I101N1.pdf](http://www.jipbs.com/VolumeArticles/FullTextPDF/437_JIPBSV6I101N1.pdf)
17. Amado S. Lecciones de dermatología. Mc Graw Hill. México; 2015. 1-10p.
18. Arenas G. Dermatología atlas, diagnóstico y tratamiento. México. Mc Graw Hill. 2015. 1-5p.
19. Marieb E. Anatomía y fisiología humana. 9<sup>na</sup> ed. España. Pearson educación. 2008.
20. Kus N, Dolinska M, Young K, Dimitriadis E, Wingfield P, Sergeev Y. Membrane-associated human tyrosinase is an enzymatically active monomeric glycoprotein. *Plos One*. [Internet]. 2018 [citado 12 de febrero del 2020]; 13 (6): 1 – 11. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0198247>
21. Ferreira I, Lima D, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol*. [Internet]. 2013 [citado 12 de febrero del 2020]; 88(1): 76 – 88. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S036505962013000100076&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S036505962013000100076&script=sci_abstract&tlng=pt)
22. Montaudié H, Bertolotto C, Ballotti R, Passeron T. Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. EMC – Dermatología. [Internet]. 2014 [citado 12 de febrero del 2020]; 48(1): 1 – 11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S176128961466800X?via%3Dihub>.

23. Nishimura E. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 401–10.
24. Stacey AN, Graeme J, Bruce C, Marjan E. Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Science*. [Internet]. 2016 [citado 12 de febrero del 2020]; 17(7): 1-11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27428965>
25. Urán ME, Cano LE. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*. [Internet]. 2008 [citado el 12 de febrero del 2020]; 12(2): 357 – 377. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n2/v12n2a07.pdf>
26. Thanigaimalai P, Vigneshwaran N, Manoj M, Sang-Hun J. Inhibitors of Melanogenesis. *Journal of Medicinal Chemistry*. [Internet]. 2018 [citado 12 de febrero del 2020]; 61 (17): 7395-7418. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763564>
27. Lozano J, Galindo J, Garcia-Barron J, Martinez-Liarte J, Peñafiel R, Solano F. *Bioquímica y biología molecular*. 3ed. McGraw-Hill. España; 2005.
28. Montaudié H, Bertolotto C, Ballotti R, Passeron T. Fisiología del sistema pigmentario. *Melanogénesis*. EMC – Dermatología. [Internet]. 2014 [citado 12 de febrero del 2020]; 48(1): Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S176128961466800X?via%3Dihub>.
29. Berbel E, Kiatkoski RC, Corrêa MA, Aparecida L. Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. [Internet]. 2013 [citado 12 de febrero del 2020]; 49(2): 201 – 209. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502013000200002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502013000200002)



30. Guía de Protección Solar Recomendaciones para comprender el etiquetado de los fotoprotectores y elegir el producto adecuado. Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo y del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. [Internet]. 2012 disponible en: [https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Documents/20\\_guia\\_solar.pdf](https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Documents/20_guia_solar.pdf)
31. Mejía J, Atehortúa L, Puertas M. Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. [Internet]. 2014 [citado 12 de febrero del 2020]; 12(4): 272-281. Disponible en: <https://dcmq.com.mx/edici%C3%B3n-octubre-diciembre-2014-volumen-12-n%C3%BAmero-4/314-foto-protecci%C3%B3n-mecanismos-bioqu%C3%ADmicos,-punto-de-partida-hacia-mejores-filtros-solares>
32. LIT Tecnología Ultravioleta, tecnología de desinfección Uv. España. [Internet] 2012. [consultado 22 de enero 2020]. Disponible en: <https://www.lit-uv.com/es/technology/>
33. Zillich O, Schweiggert U, Eisner P, Kerscher M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmet Sci*. [Internet]. 2015 [citado el 19 de diciembre del 2019]; 37: 455 – 464. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712493>
34. Esteva E. Protección Solar y Melanoma. Ámbito de acción de la farmacia. *Dermofarmacia Ámbito Farmacéutico*. [Internet]. 2009 [citado 12 de febrero del 2020]; 28(5):1-5. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13139751>

35. Panche A, Diwan A, Chandra S. Flavonoides. *Journal of Nutritional Science*. [Internet]. 2016 [citado el 19 de septiembre del 2019]; 5 (47): 1 - 15. Disponible en:  
<https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-nutritional-science/article/flavonoids-an-overview/C0E91D3851345CEF4746B10406908F52>
36. Mukund D, Laxman S. Sunscreens: A review. *Pharmacognosy Journal*. [Internet] 2016 [citado el 12 de febrero del 2020]; 8(3): 171 – 179. Disponible en:  
<https://phcogj.com/sites/default/files/10.5530pj.2016.3.1.pdf>
37. Park H., Kosmadaki M., Yaar M., Gilchrest B. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. [Internet]. 2009. [citado 12 de febrero del 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8703-8>.
38. Ortiz M, Delgado A, Herrera B, Arévalo M, Barrera A. Efecto de dos métodos de secado en los compuestos fenólicos totales, L-DOPA y la actividad antioxidante de *Vicia faba* L. *Nova Scientia*. [Internet]. 2019 [citado 12 de febrero del 2020]; 11(23): 1 - 25. Disponible en:  
[http://nova\\_scientia.delasalle.edu.mx/ojs/index.php/Nova/article/view/2093](http://nova_scientia.delasalle.edu.mx/ojs/index.php/Nova/article/view/2093)
39. Hughesa K, Hoa R, Butaudb J, Filairec E, Ranouillec E, Berthonc J, et. al. A selection of eleven plants used as traditional Polynesian cosmetics and their development potential as anti-aging ingredients, hair growth promoters and whitening products. *Journal of Ethnopharmacology*. [Internet]. 2019 [citado 12 de febrero del 2020]; 245: 1 – 17. Disponible en:  
<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-ethnopharmacology>

40. Saewan N, Jimtaisong A. Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. [Internet]. 2013 [citado 12 de febrero del 2020]; 3(09): 129-141. Disponible en: [https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1063\\_pdf.pdf](https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1063_pdf.pdf)
41. Casañola G, Marrero Y, Le-Thi H, Hassan M, Torrens F, Rescigno A, et al. “La enzima tirosinasa: 2. Inhibidores de origen natural y sintético”. [Internet]. 2013. [citado 12 de febrero del 2020]; Vol. 70, Num. 564. Disponible en: <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/273744>
42. Lemmel J. Sustancias despigmentantes y métodos de aclaramiento del color de la piel. [Internet]. 2005. [citado 08 Diciembre 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-problemas-pigmentacion-tratamiento-13042394>
43. Young A, Claveau J, Rossi A. Radiación ultravioleta y la piel: fotobiología y fotoprotección de protector solar. *J AM ACAD DERMATOL*. [Internet]. [citado 12 de febrero del 2020]; 76 (3): 100 – 109. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28038885>
44. Garrotea A., Bonet R. Fotoprotección. Factores de protección y filtros solares. *Ámbito de acción de la farmacia. Dermofarmacia* *Ámbito Farmacéutico*. [Internet]. 2008 [citado 12 de febrero del 2020]; 27(5):63-73. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-fotoproteccion-factores-proteccion-filtros-solares-13120520>
45. Arellano I, Alcalá D, Barba JF, Carlos B, Castanedo JP, Barreda F, et al. Recomendaciones clínicas para la fotoprotección en México. *DermatologíaCMQ*. [Internet]. 2014 [citado 18 de septiembre del 2019]; 12 (4): 243 – 255. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm144e.pdf>

46. Collantes J. Efectos de la radiación solar en la piel. Rev. Ecuatoriana Medica Eugenio Espejo. [Internet]. [citado 19 de septiembre de 2019]; 4(5): 3 – 6. Disponible en:  
<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-efectos-nocivos-radiacion-solar-13047747>
47. Gálvez M. Antioxidants in Photoprotection: Do They Really Work. Actas Dermo Sifiliográficas. [Internet]. [citado 12 de febrero del 2020]; 101(3): 197- 200. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398594>
48. Schalka S, Silva V. Sun protection factor: meaning and controversies. An Bras Dermatol. [Internet]. 2011[citado 12 de febrero del 2020]; 86(3): 507 – 515. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738968>
49. Díaz E, Castillo M, Sabates M, Curbelo M, Ramos N. Radiación Ultravioleta. Fotoenvejecimiento cutáneo. MediSur. [Internet]. 2005 [citado 18 de septiembre de 2019]; 3 (1): 14–33. Disponible en:  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180020172002>
50. Solari J. Genética humana: fundamentos y aplicaciones en Medicina. 3 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
51. Serna J, Vitales M, López MC, Molina A. Dermatología. [Internet]. [citado 12 de febrero del 2020]; Disponible en:  
<https://es.calameo.com/read/004937745b0626fda444b>
52. Gartner L., Hiatt J. Atlas en Color de Histología. 5<sup>ta</sup> Edi. Panamericana.2011. p. 317.
53. Cañarte K. Radiación ultravioleta y su efecto en la salud. Ciencia UNEMI [Internet].2010 [citado 18 de septiembre del 2019]. Pg 23-26. Disponible en:  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5210278>

54. Bruneton J. Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2da ed. España: Acribia SA; 1993. 227–400.
55. Marmolejo K. Variabilidad genética del frijol común tipo ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) en las localidades de Carhuaz y Chiquián, Ancash. [Tesis para optar el grado de magister en mejoramiento genético de plantas] [Lima]: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2018 [citado 19 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3398>
56. Del Pilar R. Caracterización proximal de dos variedades de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) procedente del distrito de Sarín – Provincia de Sánchez Carrión. [tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial] [Lima]: Universidad Nacional de Trujillo; 2013 [citado 19 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7506>
57. García Y. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa y grano de 54 poblaciones nativas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). [tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias Alimentarias] [Vera Cruz]: Universidad Veracruzana; 2016 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en: <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/L.-N.-Yatzil-Denih-Garcia-Diaz.pdf>
58. Cruz J, Camarena F, Pierre J, Huaranga A, Blas R. Evaluación agromorfológica y caracterización molecular de la ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.). IDESIA [Internet]. 2009 [citado 19 de septiembre del 2019]; 27(1): 29 – 40. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/250370967>

59. Tarquino L. Valoración fotoprotectora in vitro de extractos fenólicos a partir de cuatro variedades de quinua (*Chenopodium quinoa willd*) de la provincia Aroma del departamento de la Paz. [tesis para obtener el título de Ciencias Químicas] [La Paz]: Universidad Nacional de San Andrés; 2018 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en:  
<https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/18237>
60. Tobar A. Determinación de la actividad fotoprotectora in vitro de los extractos de *Chenopodium murale*. [tesis para optar el título de Bioquímico Farmacéutico] [Riobamba]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2016 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en:  
<http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/6351>
61. Garcia Y, Aquino E, Caspristan A, Chavez J. Cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en frijol. Compendio de Investigaciones Científicas en México. [Internet]. 2016 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en:  
<https://www.researchgate.net/publication/314091979%0ACuantificaci3n>
62. García Y. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en testa y grano de 54 poblaciones nativas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). [tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias Alimentarias] [Vera Cruz]: Universidad Veracruzana; 2016. Recuperado a partir de: <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/L.-N.-Yatzil-Denih-Garcia-Diaz.pdf> (56)
63. Del Gaudio M, Santi M, Mendoza S, Cabrera J, Peralta M, Ortega M. Extractos bioactivos de especies de *Dalea*: evaluación de actividad anti-tirosinasa y antifúngica. IMBIV-CONICET - Farmacognosia. [Internet]. 2016 [citado 19 de septiembre del 2019] Disponible en:  
<https://www.researchgate.net/publication/308874874>

64. Belmar M. Estudio del Efecto de Polifenoles Vegetales sobre un Modelo de Fotoenvejecimiento en Ratones SKH1. [tesis para optar el grado de doctor en Medicina] [Murcia]: Universidad de Murcia; 2014 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10201/41687>
65. Chugden R, Noa K. Efecto fotoprotector de una crema a base del extracto hidroalcohólico del *Mauritia flexuosa L.f* (aguaje) en ratones albinos. [tesis para optar el título de Químico Farmacéutico y Bioquímico] [Lima]: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/4342>
66. Aquino R, Paredes K. Evaluación de la capacidad fotoprotectora de una crema elaborada a base del extracto antociánico obtenido de los frutos de la *Muehlenbeckia volcanica* (mullaq'a) en ratones de la raza *Mus musculus var Balb/c*". [tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] [Cusco]: Universidad de San Antonio de Abad del Cusco; 2018 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/UNSAAC/330>
67. Malca K, Matara D. Desarrollo de una crema a base del extracto de *Passiflora quadrangularis L.* "tumbo" y evaluación in vitro de su efecto fotoprotector. [tesis para optar el grado de Bachiller en Farmacia y Bioquímica] [Trujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2018 [citado 20 de febrero del 2020]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10611>
68. Giurfa G, Oblitas J. Polifenoles, actividades antioxidantes, antielastasa, anticolagenasa, efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens Bory* y desarrollo de una forma dermocosmética. [tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017 [citado 20 de febrero del 2020]. Disponible en:

<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6013>

69. Salas R, Ordoñez E, Reátegui D. Polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH Y ABTS) en cuatro variedades de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) Crudo seco, remojado y cocido. Investig y Amaz. [Internet]. [citado 19 de septiembre del 2019]; 5 (1 y 2): 55 – 62. Disponible en:  
<http://revistas.unas.edu.pe/index.php/revia/article/view/59>
70. Condo M, Quispe J. Evaluación del efecto anti-tirosinasa del extracto metanólico y etilacetato de *Citrus sinensis* (naranja). [tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en:  
[https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/11311/Condo\\_rm.pdf?sequence=3](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/11311/Condo_rm.pdf?sequence=3)
71. Seijas P. Efecto fotoprotector del extracto antociánico de *Zea mays* var canteño “maíz morado” en piel de *Mus musculus* var. Balb/C ante el fotodaño agudo, subagudo y fotoenvejecimiento inducido por radiación UV-C. [tesis para optar el grado de doctor en Ciencias Biológicas] [Trujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2010 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en:  
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1059>
72. Quispe N, Blácido Z. Actividad cicatrizante y toxicidad dérmica del extracto etanólico de los tubérculos de *Ullucus tuberosus caldas* “olluco” en animales de experimentación. [tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] [Lima]: Universidad Norbert Wiener; 2018 [citado 19 de septiembre del 2019]. Disponible en:  
<http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/1734>



73. Paladino S, Zuritz C. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. [Internet]. 2011 [citado 20 de febrero 2020]; 43 (1): 187-199. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/262612597\\_Extracto\\_de semillas\\_de\\_vid\\_Vitis\\_vinifera\\_L\\_con\\_actividad\\_antioxidante\\_eficiencia\\_de\\_diferentes\\_solventes\\_en\\_el\\_proceso\\_de\\_extraccion](https://www.researchgate.net/publication/262612597_Extracto_de_semillas_de_vid_Vitis_vinifera_L_con_actividad_antioxidante_eficiencia_de_diferentes_solventes_en_el_proceso_de_extraccion)
74. García B, Saldaña A, Saldaña L. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. Revista Habanera de Ciencias Médicas. [Internet]. 2013 [citado 20 de febrero del 2020]; 12(2): 187 – 196. Disponible en:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v12n2/rhcm05213.pdf>
75. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2da Ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
76. Vargas Y, Villamil O. caracterización fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L.) cultivado en el departamento del Tolima. [tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial] [Tolima]: Universidad del Tolima; 2012 [citado 20 febrero del 2020]. Disponible en:  
<http://repository.ut.edu.co/handle/001/1251>
77. Olivo E. caracterización fitoquímica de la fracción hipoglucemiante aislada del extracto acuoso de la vaina del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) [tesis para optar el título de Ingeniero Farmacéutico] [México]: Instituto Politécnico Nacional; 2015 [citado 20 de febrero del 2020]. Disponible en:  
[https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/18722/1/proyecto%20de%20invesigacion\\_EOP.pdf](https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/18722/1/proyecto%20de%20invesigacion_EOP.pdf)

78. Hernández H, Gómez J, Ramos Y, Espinosa R, Castellón Y. Preferencia varietal de *Empoasca kraemeri* Ross y Moore sobre variedades de frijol común en Villa Clara, Cuba. Centro Agrícola. [Internet]. 2013 [citado 20 de febrero del 2020]; 40(3): 79 – 83. Disponible en:  
[http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V40-Numero\\_3/cag133131935.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V40-Numero_3/cag133131935.pdf)
79. Diaz M. Incidencia de *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en villa clara. [tesis para obtener el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas] [Santa Clara Cuba]: Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas; 2011 [citado 20 de febrero del 2020]. Disponible en:  
<http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/3579/Manuel%20Diaz%20Castellanos%20-%20Tesis%20Doctoral%5b1%5d.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
80. Sarkhail P, Salimi M, Sarkheil P, Heidarneshad F, Saeidnia S. Evaluación de las actividades antimelanogénicas y citotóxicas de *Phlomis caucasica* en células de melanoma humano SKMEL-3, Int J Cáncer Manag. 2017; 10 (3): e4633. DOI: 10.5812 / ijcm.4633.
81. Ortiz C, García M, Serrano J, Tomas V, García F. Discriminación entre sustratos alternativos e inhibidores de la tirosinasa. Revista de Química Agrícola y Alimentaria. 2015. 63 (8): 2162–2171. doi: 10.1021 / jf5051816.
82. Austin A, Calderón M, Martínez A, Ortiz J. Actividad anti-tirosinasa de ocho especies de plantas nativas de Mesoamérica usadas en aplicación dérmica. [tesis para optar el título de Químico Biólogo] [Guatemala]: Universidad San Carlos Guatemala; 2015 [citado el 19 de septiembre del 2019]. Disponible en:  
[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3715.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3715.pdf)

83. Kim Y, Uyama H. Inhibidores de la tirosinasa de fuentes naturales y sintéticas: estructura, mecanismo de inhibición y perspectiva para el futuro. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005. 62 (15): 1707-1723. DOI: 10.1007 / s00018-005-5054-y
84. Svobodova A, Walteroba D, Vostadora J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med*. 2006; 150 (1): 25- 38.
85. Lautenschlager S, Wulf H, Pittelkow M. Photoprotection. *Lancet*. 2007; 9586 (370): 528- 537.
86. Kullavanijaya P, Lim H. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 52 (6): 937- 958.
87. Ichihashi M, Ueda M, Bydiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, et al. UV- induced skin damage. *Toxicol*. 2003; 189: 21- 39.
88. Afaq F, Katiyar S. Polyphenols: Skin protection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem*. 2011; 11 (14): 1200-1215.
89. Tamaka M, Komaya Y, Nomura Y. Effects of. Collagen peptide ingestion on UVB- Induced Skin damage. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009; 73(4): 930- 932.
90. S. Ishiwatari, T. Suzuki, T. Hitomi, T. Yoshino, S. Matsukuma and T. Tsuji. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Wiley InterScience*. 2007; 27: 1–9. DOI: 10.1002/jat.1176
91. Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Elsiever*. 2006, Vol. 227, Issues (1–2): Pages 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.07.018>

## ANEXOS

### Anexo 1. Operacionalización de variables.

"ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y EFECTO FOTOPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL TEGUMENTO DE DOS VARIEDADES de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. ÑUÑA ROJA Y NEGRA"						
VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	CRITERIOS PARA ASIGNAR VALORES
Actividad anti-tirosinasa	Según naturaleza: cualitativa Según escala: nominal	Es la actividad catalítica contra la tirosinasa, que es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración de la piel.	Decoloración de la placa cromatográfica en presencia de L-tirosina 1mM	Actividad enzimática	Aparición de zonas incoloras sobre un fondo gris-violeta en una placa cromatográfica (Wangthon et al. 2007)	Presencia (+) Ausencia (-)
Efecto fotoprotector	Según naturaleza: cualitativa Según escala: nominal	Es el efecto sobre la protección de la estructura y preservación de la función de la piel humana contra el daño actínico.	Es el nivel de daño sobre la región dorsal rasurada de ratón a una extensión de 6 cm <sup>2</sup> , después de ser sometido a la exposición de radiación UV-C.	Eritematosis y edematosis	Formación de eritema	Grado de severidad de daño cutáneo, basada en sistema de Draize (OECD, 2000) Grados: 0,1,2,3 y 4.
					Formación de edema	
				Tipo de fotoenvejecimiento	sin arrugas	Escala de Glogau modificado por Seijas (2010). Tipos I, II, I y IV.
					arrugas con el movimiento	
arrugas en reposo						
sólo arrugas						
Extracto etanólico del tegumento de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. "ñuña"	Según naturaleza: cualitativa Según escala: nominal	Es el extracto obtenido por maceración en etanol de la capa que rodea a la semilla, cuya función es proteger a la semilla del medio ambiente.	Es la cáscara que recubre a la semilla de cada variedad de ñuña molida y macerada en etanol al 70%.	Extracto etanólico de ñuña roja	extracto etanólico (mg)	variedad de ñuña color: roja y negra
				Extracto etanólico de ñuña negra	extracto etanólico (mg)	

## Anexo 2. Matriz de consistencia.

Planteamiento del problema	Objetivos	Hipótesis	Justificación	Variable	Tipo de variable	Técnicas, instrumentos de recolección de datos
<p><b>Problema General:</b> ¿El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra tiene actividad anti-tirosinasa y efecto fotoprotector?</p> <p><b>Problemas específicos:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ¿El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra tiene presencia de metabolitos?</li> <li>2. ¿El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra produce toxicidad una dosis de 500mg/kg?</li> <li>3. ¿El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra produce actividad anti-tirosinasa?</li> <li>4. ¿El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra tiene efecto fotoprotector?</li> </ol>	<p><b>Objetivo General:</b> Comprobar la actividad anti-tirosinasa y el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Determinar cualitativamente la presencia de los componentes fitoquímicos presentes en el extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra.</li> <li>2. Evaluar la toxicidad aguda a dosis límite de 5000 mg/kg del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra, en ratas Holtzman.</li> <li>3. Determinar la actividad anti-tirosinasa del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra por el método cualitativo mediante cromatografía en capa fina.</li> <li>4. Evaluar el efecto fotoprotector del extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra en ratones inducidos por radiación.</li> </ol>	<p>Hipótesis De investigación (H<sub>1</sub>)</p> <p>El extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña” roja y negra tiene actividad anti-tirosinasa y efecto fotoprotector</p>	<p>El presente trabajo se justifica:</p> <p><b>Aspecto salud:</b> No existe la menor duda sobre el peligro de exponernos mucho tiempo al sol, sin embargo no se toman las debidas precauciones para evitar las consecuencias de la radiación solar acumulativa, por ello la presente investigación permitirá optar con una alternativa terapéutica para evitar lesiones inmediatas que van desde un pequeño enrojecimiento de la piel a auténticas quemaduras, o lesiones tardías como fotoenvejecimiento, fotosensibilidad, queratosis actínicas, cáncer de piel e hiperpigmentación cutánea.</p> <p><b>Aspecto económico:</b> La ñuña presenta compuestos que pueden ser estudiados para conocer qué tan viables o aplicables son en seres humanos para cumplir con el objetivo de protección frente a la radiación, ello permitirá la prevención del fotodaño e hiperpigmentación, al contar con recurso natural de bajo costo y promover el cultivo ya que el potencial de este tipo de frijol aun es poco explorado, pues no se le ha dado la importancia como producto innovador dentro de la economía tradicional de los pueblos andinos; tanto así, que solo se concentra en pequeños cultivos de las zonas de tierras altas de Perú.</p> <p><b>Aspecto social:</b> Contribuirá con la identificación de nuevos compuestos que podrían ser utilizados como filtros solares naturales, los mismos que después de los estudios correspondientes podrán ser aprobados para ser empleados en formulaciones tópicas, ya sea en conjunto con otros filtros o en solitario. Así se podrá ir mejorando la protección contra la radiación UV y disminuyendo la incidencia de cáncer de piel e hiperpigmentación cutánea en nuestro país.</p>	<p><b>Variable independiente</b></p> <p>Extracto etanólico del tegumento de dos variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “ñuña”</p> <p><b>Variables dependientes</b></p> <p>Actividad anti-tirosinasa</p> <p>Efecto fotoprotector</p>	<p><b>Según naturaleza:</b> cualitativa</p> <p><b>Según escala:</b> nominal</p> <p><b>Según naturaleza:</b> cualitativa</p> <p><b>Según escala:</b> nominal</p> <p><b>Según naturaleza:</b> cualitativa</p> <p><b>Según escala:</b> nominal</p>	<p>Anatomía patológica. Por coloración: Fontana Masson (Lynch, 1972). Citado por (Gonzales y Ramírez 2014).</p> <p>Toxicidad dérmica (DL 50): Contero y Dehesa 2004) citado por (Quispe y Blacido 2018)</p> <p>Actividad anti-tirosinasa: (Wangthong et al. 2007) Citado por (Condo y Quispe 2019).</p> <p>Efecto fotoprotector: Draize (OECD, 2000) y (Fisher, 2005) citado por (Seijas 2010)</p>

## Anexo 3. Descripción taxonómica



VICERRECTORADO DE  
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



*"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"*

### CONSTANCIA N° 463-USM-2019

LA JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Liliana Papuico Sánchez y Ermitanio Mera Santa Cruz**; estudiante de la Universidad Privada Norbert Wiener, ha sido estudiada y clasificada como: ***Phaseolus vulgaris* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: FBALES**

**FAMILIA: FABACEAE**

**GENERO: *Phaseolus***

**ESPECIE: *Phaseolus vulgaris* L**

Nombre vulgar: "ñuña" "frejol"  
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere conveniente.

Lima, 17 de diciembre de 2019



*Joaquina Albán Castillo*  
**Dra. Joaquina Albán Castillo**  
JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb

## Anexo 4. Análisis estadístico a detalle del Efecto fotoprotector

Grado de edema

### 1. Análisis de la variancia

Se necesita conocer si los datos siguen una distribución normal, como los datos son menores a 50, entonces se aplica la prueba de Shapiro wilks

Ho: La muestra tiene distribución normal ( $p>0.05$ )

H1: La muestra no tiene distribución normal ( $p<0.05$ )

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
edema	,234	35	,000	,838	35	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Conclusión: como el valor es menor a 0.05 entonces la muestra no es normal y por lo tanto se aplica una prueba de análisis de variancia no paramétrica (Kruskall Wallis).

Ho: El grado de edema es la mismo entre grupos ( $p>0.05$ )

H1: El grado del edema no es la mismo entre grupos ( $p<0.05$ )

null : null

### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de edema es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,001	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es d

Conclusión: como el p-valor es menor a 0.05 entonces existe diferencia significativa entre grupos respecto a su grado de edema. Entonces para conocer la diferencia entre grupos se aplica una prueba de comparación de medias entre grupos de tipo no paramétrica (U de Mann Whitney).

Cada nodo muestra el rango promedio de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Ñuña negra 2%-Ñuña roja 2%	,000	6,168	,000	1,000	1,000
Ñuña negra 2%-Ñuña negra 5%	-4,000	6,168	-,648	,517	1,000
Ñuña negra 2%-BLOQUEADOR	4,200	6,168	,681	,496	1,000
Ñuña negra 2%-CONTROL GEL BASE	17,400	6,168	2,821	,005	,101
Ñuña negra 2%-Ñuña roja 5%	-17,400	6,168	-2,821	,005	,101
Ñuña negra 2%-CONTROL SIN GEL	19,300	6,168	3,129	,002	,037
Ñuña roja 2%-Ñuña negra 5%	4,000	6,168	,648	,517	1,000
Ñuña roja 2%-BLOQUEADOR	4,200	6,168	,681	,496	1,000
Ñuña roja 2%-CONTROL GEL BASE	17,400	6,168	2,821	,005	,101
Ñuña roja 2%-Ñuña roja 5%	-17,400	6,168	-2,821	,005	,101
Ñuña roja 2%-CONTROL SIN GEL	19,300	6,168	3,129	,002	,037
Ñuña negra 5%-BLOQUEADOR	,200	6,168	,032	,974	1,000
Ñuña negra 5%-CONTROL GEL BASE	13,400	6,168	2,172	,030	,626
Ñuña negra 5%-Ñuña roja 5%	-13,400	6,168	-2,172	,030	,626
Ñuña negra 5%-CONTROL SIN GEL	15,300	6,168	2,480	,013	,276
BLOQUEADOR-CONTROL GEL BASE	-13,200	6,168	-2,140	,032	,679
BLOQUEADOR-Ñuña roja 5%	-13,200	6,168	-2,140	,032	,679
BLOQUEADOR-CONTROL SIN GEL	-15,100	6,168	-2,448	,014	,302
CONTROL GEL BASE-Ñuña roja 5%	,000	6,168	,000	1,000	1,000
CONTROL GEL BASE-CONTROL SIN GEL	-1,900	6,168	-,308	,758	1,000
Ñuña roja 5%-CONTROL SIN GEL	1,900	6,168	,308	,758	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.



## Edema

Duncan<sup>a,b</sup>

Grupo	N	Subconjunto	
		1	2
Ñuña negra 2%	5	,2000	
Ñuña roja 2%	5	,2000	
BLOQUEADOR	5	,6000	
Ñuña negra 5%	5	,6000	
CONTROL GEL BASE	5		2,0000
Ñuña roja 5%	5		2,0000
CONTROL SIN GEL	5		2,2000
Sig.		,362	,636

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática

(Error) = ,386.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

b. Alfa = 0.05.

## Grado de Fotoenvejecimiento

### 1. Análisis de la variancia

Se necesita conocer si los datos siguen una distribución normal, como los datos son menores a 50, entonces se aplica la prueba de Shapiro wilks

Ho: La muestra tiene distribución normal ( $p > 0.05$ )

H1: La muestra no tiene distribución normal ( $p < 0.05$ )

### Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
envejecimiento	,223	35	,000	,802	35	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Conclusión: como el valor es menor a 0.05 entonces la muestra no es normal y por lo tanto se aplica una prueba de análisis de variancia no paramétrica (Kruskal Wallis).

Ho: El grado de fotoenvejecimiento es el mismo entre grupos ( $p > 0.05$ )

H1: El grado de fotoenvejecimiento no es el mismo entre grupos ( $p < 0.05$ )

null : null

### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de envejecimiento es la misma entre las categorías de grupo.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05

Conclusión: como el p-valor es menor a 0.05 entonces existe diferencia significativa entre grupos respecto a su grado de fotoenvejecimiento. Entonces para conocer la diferencia entre grupos se aplica una prueba de comparación de medias entre grupos de tipo no paramétrica (U de Mann Whitney).

Cada nodo muestra el rango promedio de muestras de grupo.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Ñuña negra 5%-Ñuña roja 5%	,000	6,100	,000	1,000	1,000
Ñuña negra 5%-Ñuña negra 2%	11,500	6,100	1,885	,059	1,000
Ñuña negra 5%-Ñuña roja 2%	-11,500	6,100	-1,885	,059	1,000
Ñuña negra 5%-BLOQUEADOR	16,500	6,100	2,705	,007	,143
Ñuña negra 5%-CONTROL GEL BASE	24,000	6,100	3,935	,000	,002
Ñuña negra 5%-CONTROL SIN GEL	24,000	6,100	3,935	,000	,002
Ñuña roja 5%-Ñuña negra 2%	11,500	6,100	1,885	,059	1,000
Ñuña roja 5%-Ñuña roja 2%	11,500	6,100	1,885	,059	1,000
Ñuña roja 5%-BLOQUEADOR	16,500	6,100	2,705	,007	,143
Ñuña roja 5%-CONTROL GEL BASE	24,000	6,100	3,935	,000	,002
Ñuña roja 5%-CONTROL SIN GEL	24,000	6,100	3,935	,000	,002
Ñuña negra 2%-Ñuña roja 2%	,000	6,100	,000	1,000	1,000
Ñuña negra 2%-BLOQUEADOR	5,000	6,100	,820	,412	1,000
Ñuña negra 2%-CONTROL GEL BASE	12,500	6,100	2,049	,040	,849
Ñuña negra 2%-CONTROL SIN GEL	12,500	6,100	2,049	,040	,849
Ñuña roja 2%-BLOQUEADOR	5,000	6,100	,820	,412	1,000
Ñuña roja 2%-CONTROL GEL BASE	12,500	6,100	2,049	,040	,849
Ñuña roja 2%-CONTROL SIN GEL	12,500	6,100	2,049	,040	,849
BLOQUEADOR-CONTROL GEL BASE	-7,500	6,100	-1,230	,219	1,000
BLOQUEADOR-CONTROL SIN GEL	-7,500	6,100	-1,230	,219	1,000
CONTROL GEL BASE-CONTROL SIN GEL	,000	6,100	,000	1,000	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

## Envejecimiento

Duncan<sup>a,b</sup>

Grupo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Ñuña negra 5%	5	1,0000			
Ñuña roja 5%	5	1,0000			
Ñuña negra 2%	5		2,0000		
Ñuña roja 2%	5		2,0000		
BLOQUEADOR	5			2,4000	
CONTROL GEL BASE	5				3,0000
CONTROL SIN GEL	5				3,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

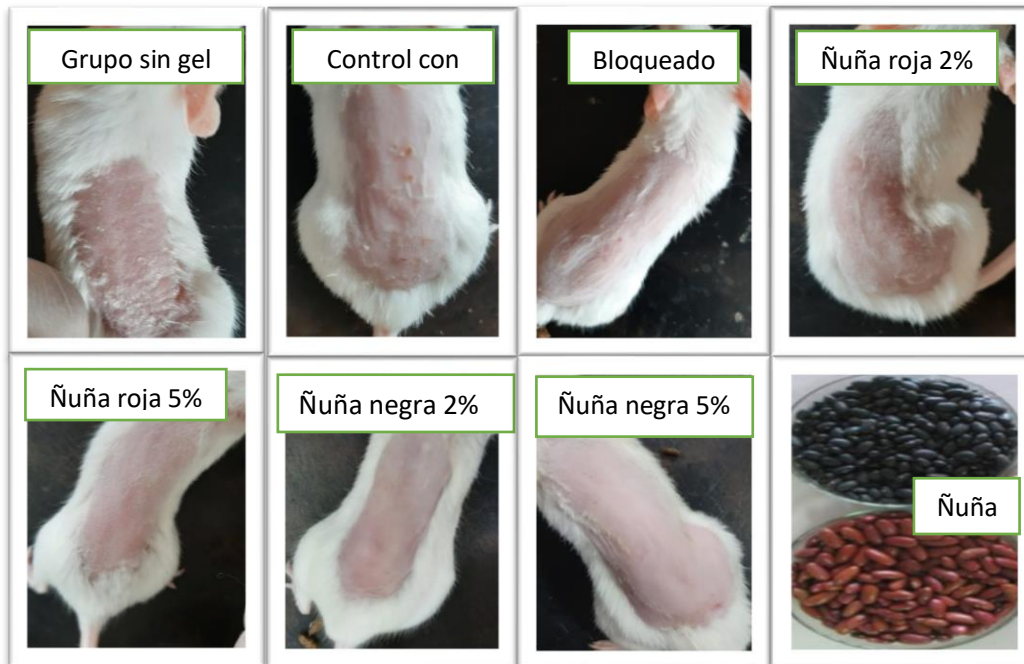
Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,043.

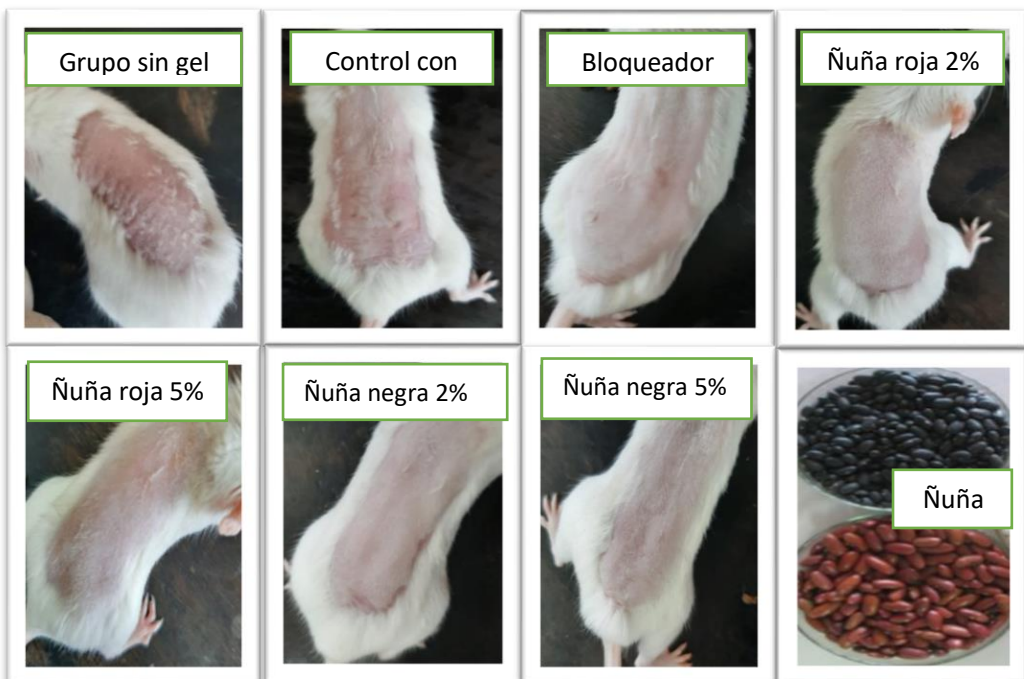
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

b. Alfa = 0.05.

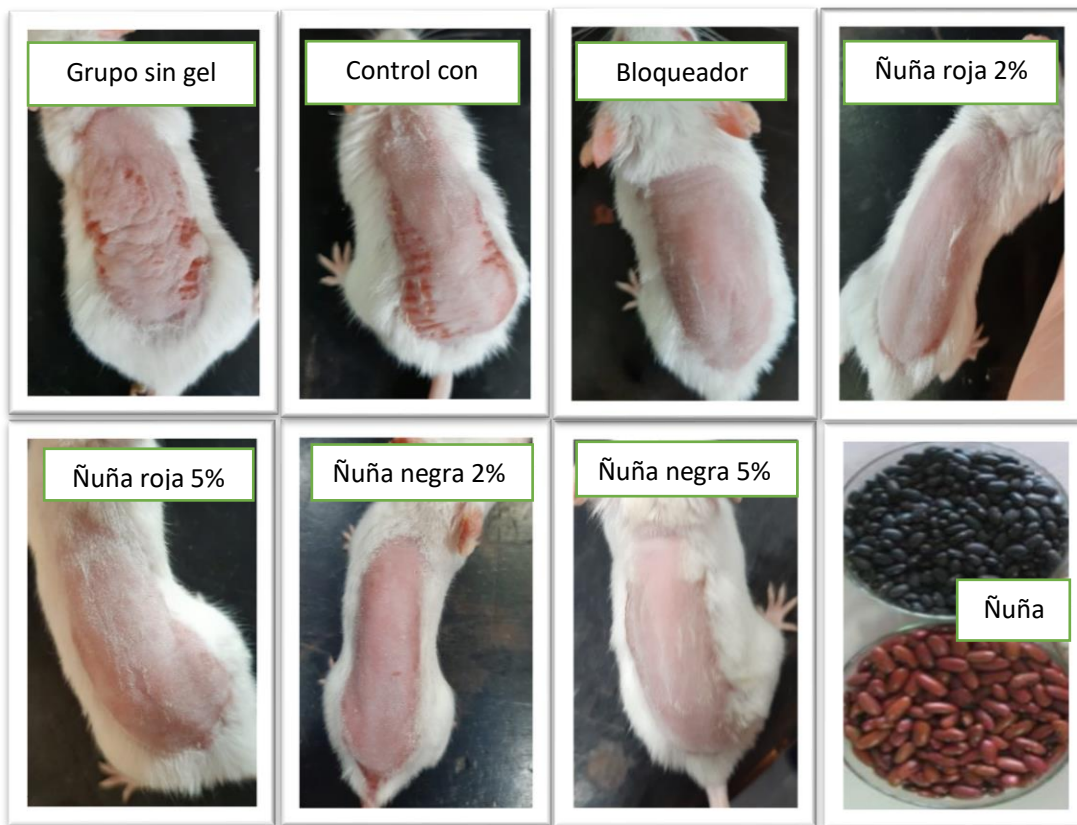
**Anexo 5. Vista macroscópica del fotodaño en ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 según grupo experimental en siete días.**



**Figura 13. Vista macroscópica del fotodaño en ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 al tercer día de aplicados los tratamientos por grupo experimental**



**Figura 134. Vista macroscópica del fotodaño en ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 al cuarto día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.**



**Figura 145. Vista macroscópica del fotodaño en ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 al quinto día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.**



**Figura 16. Vista macroscópica del fotodaño en ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 al sexto día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.**

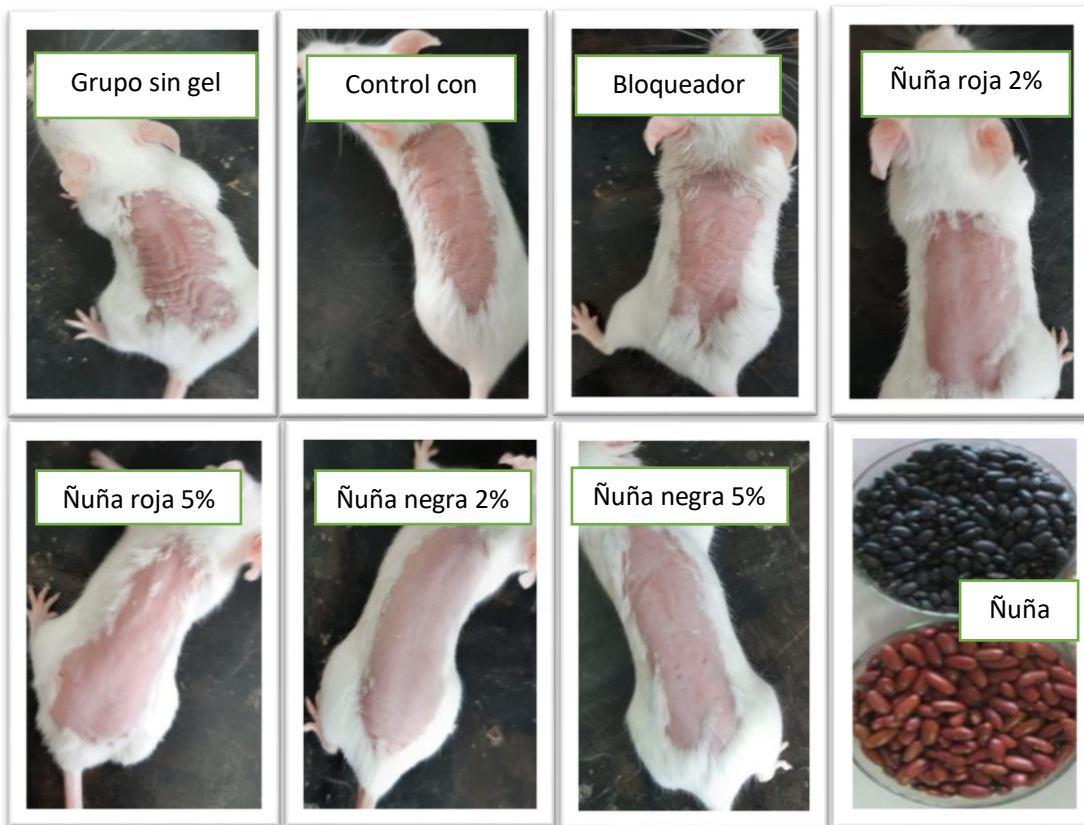


Figura 157. Vista macroscópica del fotodaño en ratones de la especie *Mus musculus* cepa Balb/C53 al séptimo día de aplicados los tratamientos por grupo experimental.

### Anexo 6. Evidencias del proceso investigativo.



Figura 168. Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. para la identificación taxonómica y tegumentos de ñuña roja y negra.



**Figura 19.** Proceso de secado y molienda del tegumento y del extracto.



**Figura 170.** Geles preparados por concentración y variedad de ñaña.



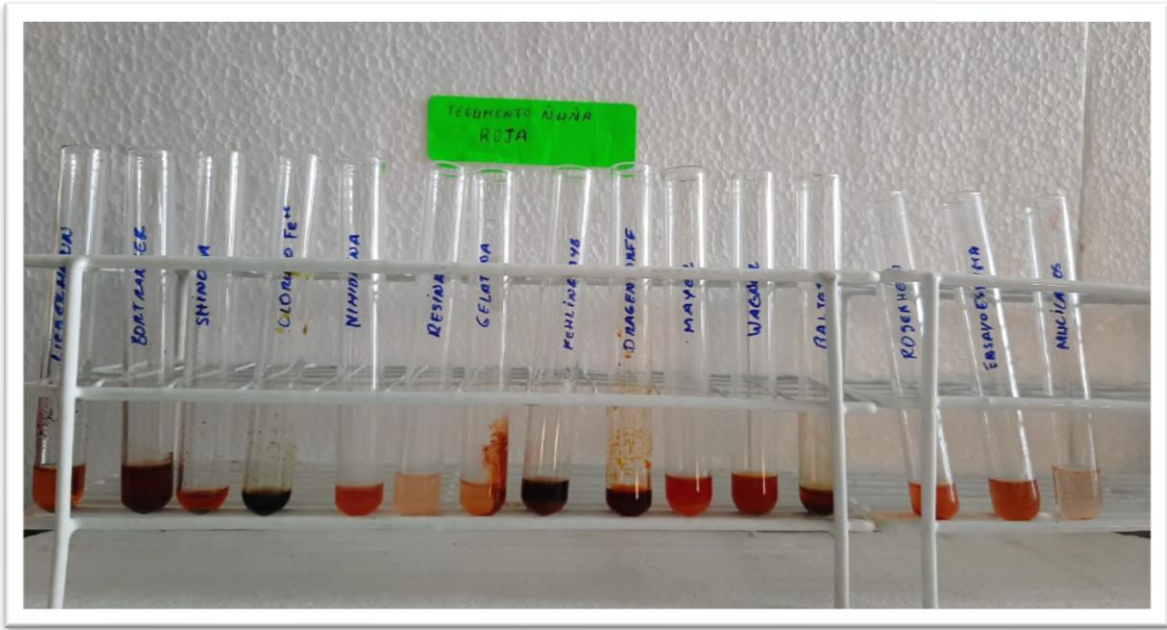


Figura 181. Identificación cualitativa de componentes fitoquímicos en ñuña roja.

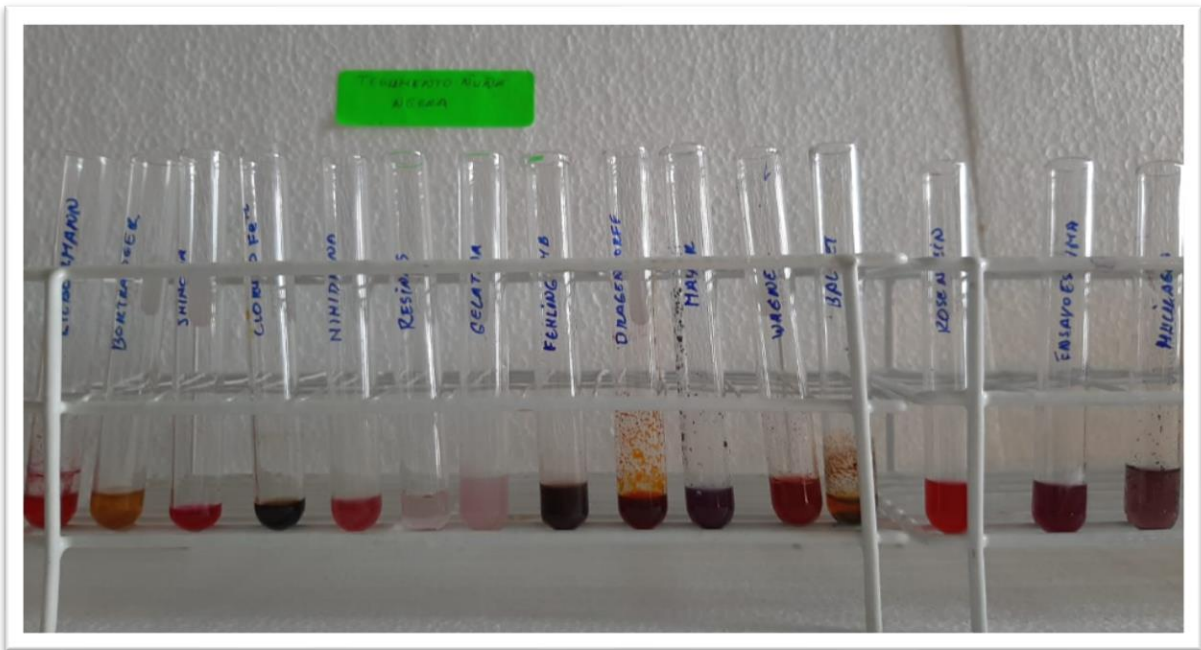


Figura 192. Identificación cualitativa de componentes fitoquímicos en ñuña negra.

# Anexo 7. Certificado de Análisis L- Tirosina



## Certificate of Analysis

1.08371.0025 L-Tyrosine for biochemistry  
Batch K47746771

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (perchloric acid titration, calculated on dried substance)	99.0 - 101.0	%	99.7	%
Identity (IR-spectrum)	passes test		passes test	
Appearance	white, crystalline powder or colorless crystals		passes test	
Spec. rotation (α 20/D, 50 g/l, hydrochloric acid 1 mol/l, calc. on dried substance)	-11.0 to -12.3	°	-12.0	°
Chloride (Cl)	≤ 0.02	%	≤ 0.02	%
Sulfate (SO <sub>4</sub> )	≤ 0.01	%	≤ 0.01	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
As (Arsenic)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Ca (Calcium)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Co (Cobalt)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Fe (Iron)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
K (Potassium)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Na (Sodium)	≤ 0.01	%	≤ 0.01	%
NH <sub>4</sub> (Ammonium)	≤ 0.01	%	≤ 0.01	%
Zn (Zinc)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
L-Phenylalanine	≤ 0.5	%	< 0.1	%
other foreign amino acids	≤ 0.2	%	≤ 0.2	%
Other ninhydrine positive substances	≤ 0.1	%	≤ 0.1	%
Loss on drying (105 °C; 3 h)	≤ 0.3	%	< 0.1	%

Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.03.2021

Dr. Ralf Burgert  
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

## Anexo 8. Certificado de Análisis de la Enzima Tirosinasa

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

### Certificate of Analysis

Product Name:

Tyrosinase from mushroom - lyophilized powder,  $\geq 1000$  unit/mg solid

**Product Number:** T3824  
**Batch Number:** SLBZ0022  
**Brand:** SIGMA  
**CAS Number:** 9002-10-2  
**MDL Number:** MFCD00082118  
**Storage Temperature:** Store at -20 °C  
**Quality Release Date:** 01 OCT 2018  
**Recommended Retest Date:** OCT 2021

Test	Specification	Result
units/mg Solid Tyrosinase Activity Unit Definition: One unit will cause an increase in A280 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mix containing L-tyrosine	$\geq 1000$	7164
units/mg Solid Polyphenol Oxidase Activity Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C. In a 3 mL reaction mixture containing L-Beta-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA)	$\geq 30000$	149192
units/mg Solid Catechol Oxidase Activity Unit Definition: One unit will cause a decrease in A265 of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 deg C in a 3 mL reaction mixture containing catechol and ascorbic acid	$\geq 30000$	1431095

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 2

## Anexo 9. Carta del comité de ética

Lima, 10 de Febrero del 2020

### **Mg. Hugo Justil Guerrero**

Profesor tiempo completo. Miembro de la Comisión de Grados y Títulos  
E.A.P. Farmacia y Bioquímica.  
Universidad Privada Norbert Wiener

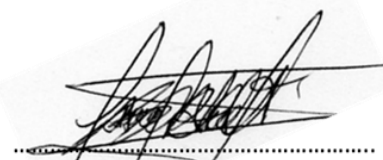
**Asunto:** Dictamen de informe de comité de ética, del proyecto “ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y EFECTO FOTOPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL TEGUMENTO DE DOS VARIEDADES de *Phaseolus vulgaris* ÑUÑA ROJA Y NEGRA”

El Código de Ética para la Investigación de la Universidad Privada Norbert Wiener es un instrumento que tiene por finalidad proteger los derechos, de la vida, la salud, la intimidad, la dignidad y el bienestar de las personas y de todo ser vivo que participen o van a participar de proyectos de investigación, de modo que estos en su ejecución se cifian a los principios éticos acogidos por la normatividad nacional e internacional, y los acuerdos suscritos por nuestro país en la materia.

El presente proyecto se ajusta a los principios que rigen la actividad investigadora de la Universidad, la misma que está contemplada en el Código de Ética para la Investigación, Setiembre 2019- V02. 1/13. Capítulo III. Artículo N° 6 (principios: a, c, e, f, g). Así mismo se informa que la asesora esta de acorde como investigador citado en el Artículo N° 7, con todos sus lineamientos.

Visto y revisado, el proyecto de tesis intitulado: “ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y EFECTO FOTOPROTECTOR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL TEGUMENTO DE DOS VARIEDADES de *Phaseolus vulgaris* ÑUÑA ROJA Y NEGRA”, presentado por Br. Mera Santa Cruz Ermitanio y Br. Papuico Sánchez Liliana Eulalia y asesora Dra. Juana Elvira Chávez Flores.

Los interesados pueden continuar con el trámite documentario y desarrollar la investigación, por cumplir con la normatividad vigente de investigación.



.....  
Dra. Britt Alvarado Chávez  
Presidenta del Comité de Ética  
Universidad Privada Norbert Wiener

**Adjunto:** Proyecto de investigación revisado.