

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICA

EVALUACIÓN DE IRRITABILIDAD POR EL MÉTODO DEL  
HET- CAM DEL GEL ELABORADO CON EXTRACTO  
HIDROALCÓHOLICO DE LAS HOJAS DE *Phymatosorus*  
*grossus* (CALAGUALA)

Tesis para optar al Título Profesional de Químico  
Farmacéutico y Bioquímico

TESISTA:

Bach. Moreno Rivas Gabriela Nataly  
Bach. Quiroz Sierralta Richard Franz

ASESOR: Mg. Henry Sam Montellanos Cabrera.

Lima – Perú

2018

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a Dios por permitirme tener vida, salud y poder realizar uno más de mis propósitos que es ser Química Farmacéutica y Bioquímica. Aunque el camino se comience a presentar difícil, siempre encontrarás la ayuda idónea para tu momento. En mi caso, conté con la ayuda y la inigualable presencia de mi madre Precila Rivas Santana, y por eso dedico a ella esta tesis; la dedico en acto de reconocimiento por su esfuerzo y compromiso con mi vida y con mis metas. A mi padre Celso Moreno Rojas por su esfuerzo y dedicación, esto no tiene margen alguno de comparación, disfrutar y aprender de cada error, errores que a la larga solo se convirtieron en nuevas enseñanzas, porque al lado de un caballero como mi padre, cada momento es único en su excelencia. Gracias a mi padre por estar presente en mi vida y apoyarme en el desarrollo y la construcción de esta tesis. Gracias por ser los mejores padres de todos. A mis hermanos Ketty y Elkin, por su ejemplo, quienes me enseñaron que con el trabajo y perseverancia se encuentra el éxito profesional; a mi sobrina Keylita gracias Familia por todo el apoyo brindado a lo largo de mi carrera.

### **Gabriela**

Esta tesis va dedicada a una mujer que nunca dejó de creer en mi cuando yo ya había dejado de creer que lo lograría, pero hoy en día es un logro más que gracias a su perseverancia, su amor, su cariño, su compañía y por muchas cosas más que ha hecho por mí: mi Madre Mery Sierralta Vila de Quiroz. Te quiero mucho. Esta tesis es para ti, por tu esfuerzo y dedicación, por hacerme alguien más en esta vida. Te amo mamá.

### **Richard**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos en primer lugar a Dios por su infinita bondad para estar donde estamos, ya que el guió nuestros pasos para el bien común. A la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, donde nos formamos para ser unos excelentes profesionales de la salud y colaborar con nuevas alternativas para la comunidad científica, como también a nuestro asesor Mgtr. Henry Montellanos Cabrera por el tiempo y su conocimiento que nos brindó por guiarnos en nuestro proyecto de tesis. Gracias.

**Gabriela / Richard**

# ÍNDICE

**Dedicatoria**

**Agradecimiento**

**Índice de figuras**

**Índice de tablas**

**Índice de anexos**

**Abreviaturas**

**Resumen**

**Abstract**

	<b>Página</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
1.1 Descripción de la realidad problemática	<b>3</b>
1.2 Problemas	<b>4</b>
1.2.1 Problema general	<b>4</b>
1.2.2 Problemas específicos	<b>4</b>
1.3 Objetivos	<b>5</b>
1.3.1 Objetivo general	<b>5</b>
1.3.2 Objetivos específicos	<b>5</b>
1.4 Justificación	<b>6</b>
1.5 Limitaciones metodológicas	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
2.1 Antecedentes	<b>8</b>
2.1.1 Antecedentes nacionales	<b>8</b>
2.1.2 Antecedentes extranjeros	<b>11</b>
2.2 Bases teóricas y legales	<b>12</b>
2.2.1 Normas legales	<b>12</b>
2.2.2 Cicuales	<b>14</b>
2.2.3 HET-CAM	<b>14</b>
2.2.4 Calaguala	<b>15</b>

2.2.4.1	Habitad	16
2.2.4.2	Historia	16
2.2.4.3	Parte utilizada	17
2.2.4.4	Composición química	17
2.2.4.5	Acciones farmacológicas	17
2.3	Hipótesis	19
2.3.1	Hipótesis general	19
2.3.2	Hipótesis específicas	19
2.4	Operacionalización de variables	20
2.5	Definición de términos básicos	21
	<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b>	<b>23</b>
3.1	Tipo y diseño de investigación	23
3.2	Población y muestra	23
3.3	Equipos, materiales y reactivos	24
3.4	Procedimientos	26
3.5	Procesamiento de datos	33
	<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1	Presentación	34
4.2	Contrastación de hipótesis	38
4.3	Discusión	42
	<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>43</b>
5.1	Conclusiones	43
5.2	Recomendaciones	44
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	página
<b>Gráfico N 1:</b> Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico <i>Phymatosorus grossus</i> ( Calaguala)	<b>34</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	página
<b>Tabla N 1:</b> Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>34</b>
<b>Tabla N 2:</b> Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>35</b>
<b>Tabla N 3:</b> Soluciones de los controles para evaluación del método HET – CAM	<b>36</b>
<b>Tabla N 4:</b> Índice de irritabilidad por el método HET–CAM del extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>36</b>
<b>Tabla N 5:</b> Índice de irritabilidad por el método HET–CAM base Gel de Carbapol, Trietanolamina Agua	<b>37</b>
<b>Tabla N 6:</b> Resultados del método HET – CAM GEL con el extracto hidroalcohólico de las hojas <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>37</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

	página
<b>Figura N 1</b> Recolección de hojas de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>49</b>
<b>Figura N 2</b> Selección de hojas de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>49</b>
<b>Figura N 3</b> Pesaje de hojas de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>50</b>
<b>Figura N 4</b> Trozado de hojas de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>50</b>
<b>Figura N 5</b> Hojas maceración de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>51</b>
<b>Figura N 6</b> Hojas filtrado de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>52</b>
<b>Figura N 7</b> Extracto seco de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>54</b>
<b>Figura N 8</b> Prueba de solubilidad de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>54</b>
<b>Figura N 9</b> Marcha fitoquímica de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>55</b>
<b>Figura N 10</b> Prueba de HET-CAM con el extracto de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>56</b>
<b>Figura N 11</b> Ovoscopio artesanal para el HET-CAM	<b>56</b>
<b>Figura N 12</b> Señalización de la cámara de aire para romper el huevo	<b>57</b>
<b>Figura N 13</b> Ruptura de la cáscara de la cámara de aire del huevo	<b>57</b>
<b>Figura N 14</b> Procedimiento de HET-CAM del extracto hidroalcohólico de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>58</b>
<b>Figura N 15</b> Procedimiento de HET-CAM del extracto hidroalcohólico de <i>Phymatosorus grossus</i> (Calaguala)	<b>59</b>



## ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatorio no esteroide
CAM	Membrana corioalantoidea del huevo de gallina
CONCYTEC	Consejo nacional de ciencia, tecnología e innovación tecnológica
CICUA	Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
IR	Índice de irritación
RRR	Tres “erres” de Rusell y Burch: reducción, refinamiento y reemplazo

## Resumen

El objetivo de la investigación fue evaluar el índice de irritabilidad del gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala). El tipo de investigación fue analítico transversal, el diseño utilizado fue de tipo experimental, los indicadores tomados en cuenta para la determinación del índice de irritabilidad fueron: hemorragia, lisis y coagulación. Para determinar el índice de irritabilidad se emplearon 55 huevos de gallina fértiles, divididos en 11 grupos, los grupos estuvieron divididos en controles positivos, blanco, solvente, además extracto hidroalcohólico al 5, 2, 1, 0.5%, asimismo se formó un grupo para evaluar el gel y dos grupos para el gel al 1% y 0.5% elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala); cada grupo utilizó 5 huevos de gallina fértil. Se determinó los tiempos de hemorragia lisis y coagulación por el método del HET- CAM. Se pudo determinar que el extracto es muy soluble en agua y etanol, soluble en metanol y poca solubilidad en acetona. Los metabolitos encontrados fueron flavonoides, alcaloides, naftaquinonas, antraquinonas y antranonas, saponinas y glicosidos. Los resultados del método HET-CAM del extracto hidroalcohólico de *Phymatosorus grossus* (Calaguala), demostró que a la concentración de 1 y 2%, se clasificó como irritante moderado, obteniéndose un índice de irritación de 5,25 y 8,78, sin embargo, a la concentración del 0.5% demostró un índice de irritación de 2,54 calificándose como irritante leve, por otra parte, el gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) a la concentración de 1% presentó un índice de irritabilidad moderado 5,96 y a la concentración de 0.5% demostró un índice de irritabilidad de 0.96 clasificándolo como no irritante. Conclusiones: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5% demostró tener un índice de irritación leve y es propicia esta concentración para la elaboración de formas farmacéuticas como geles, cremas y lociones. Estos estudios abren las puertas para evaluación clínica con seguimiento farmacéutico.

**Palabras clave:** HET-CAM, membrana, corioalantoidea, índice irritante, extracto hidroalcohólico, calaguala.

## Abstract

The objective of the investigation was to evaluate the irritability index of the gel made with the hydroalcoholic extract of the leaves of *Phymatosorus grossus* (Calaguala). The type of research was transversal, the design used was experimental, the indicators taken into account for the determination of the index of irritability were: bleeding, lysis and coagulation. To determine the index of irritability, 55 fertile chicken eggs were used, divided into 11 groups, the groups were divided into positive controls, white, solvent, and hydroalcoholic extract at 5, 2, 1, 0.5%, and a group was formed to evaluate the gel and two groups for the 1% and 0.5% gel made with the hydroalcoholic extract of the leaves of *Phymatosorus grossus* (Calaguala); each group used 5 fertile chicken eggs. The bleeding and lysis and coagulation times were determined by the HET-CAM method. It was determined that the extract is very soluble in water and ethanol, soluble in methanol and poor solubility in acetone. The metabolites found were flavonoids, alkaloids, naphtaquinones, anthraquinones and anthranones, saponins and glycosides. The results of the HET-CAM method of the hydroalcoholic extract of *Phymatosorus grossus* (Calaguala), demonstrated at the concentration of 0.5% an index of irritation of 2.54 qualifying as a mild irritant, however, the gel made with the hydroalcoholic extract of *Phymatosorus grossus* (Calaguala) at the 0.5% concentration showed an irritability index of 0.96, classifying it as non-irritant. Conclusions: The hydroalcoholic extract of the leaves of *Phymatosorus grossus* (Calaguala) at 0.5% proved to have a mild irritation index and this concentration is favorable for the preparation of pharmaceutical forms such as gels, creams and lotions. These studies open the doors for clinical evaluation with pharmaceutical follow-up.

**Key words:** HET-CAM, chorioallantoic membrane, irritant index, hydroalcoholic extract, calaguala.

## Introducción

El cuerpo humano está sujeto a diferentes noxas en el medio que le rodea. Estas noxas pueden provocar, por ejemplo, alteraciones dérmicas, que se observan cuando hay enrojecimiento (eritema) e inflamación (edema) en la piel. Las alteraciones fisiológicas se pueden producir por la presencia de agentes extraños (biológicos, químicos, físicos). Un tipo de irritación importante que causa daño y alteraciones fisiológicas de gravedad, es la irritación ocular (estos daños ocasionan quemosis, secreciones, opacidad corneal) que pueden causar sensibilización. (1)

Hoy las grandes empresas europeas están a la búsqueda de productos con actividad biológica eficaz sobre todo en el área cosmética, para ello los insumos provenientes de especies vegetales de diferentes países, deben ser de naturaleza no irritante. Perú es una fuente de estos insumos vegetales con actividad terapéutica, pero en nuestro país no hay estudios que evidencien seguridad y eficacia, ya que estos requieren estudios por laboratorios dedicados a la investigación. (2)

Muchas de las pruebas para determinar la actividad de los activos terapéuticos requieren el uso de animales de experimentación. Hoy numerosos laboratorios han cambiado su forma de pensar y están utilizando métodos alternativos para evaluar la seguridad y eficacia de los activos naturales a base de técnicas de HET-CAM (hen's egg test chorioallantoic membrane) la cual se efectúa en huevos de gallina fértiles y en la membrana corioalantoidea. Este método que día a día va ganando más aceptación por el mundo científico es apreciado por su rapidez para determinar el índice de irritabilidad.

En la búsqueda de métodos simples, sensibles, fáciles de ejecutar y de bajo costo, se suma a que en Perú existe una tradición de crianza de

animales de corral (gallinas) que son muy importantes para la obtención de huevos fértiles.

Para evaluar productos cosméticos, la normativa en el Perú todavía exige el uso de modelos de experimentación *Oryctolagus cuniculus* (Conejos); sin embargo, a nivel mundial, es una exigencia el usar métodos alternativos para evaluar irritación y toxicidad,

La técnica de análisis por el método HET-CAM aún no ha sido implementada en laboratorios. Pensamos por ello, al desarrollar este trabajo se ve conveniente proponer a la comunidad científica el empleo de esta nueva alternativa para la evaluación de índice de irritabilidad e implementar esta técnica en el futuro en todos los laboratorios cosméticos, disminuyendo paulatinamente el uso de animales.

# CAPÍTULO I.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Descripción de la realidad problemática

Para evaluar nuevas formas farmacéuticas y demostrar el potencial toxico farmacológico de los mismos, los ensayos emplean animales vivos, los cuales sufren por demostrar la inocuidad del fármaco o cosmético. En 1944, el investigador toxicólogo, John H. Draizer, propuso el empleo de una sorprendente e innovadora técnica para evaluar el índice de irritabilidad de los activos químicos. La técnica tradicional para evaluar un activo utiliza conejos a los cuales se les adiciona una pequeña cantidad de muestra (ojo, mucosa, piel) la cual después de unos minutos se observa su efecto y se evalúa el resultado. Estas pruebas, para algunos sectores, son consideradas crueles ya que el animal de experimentación, por acción del activo, puede sufrir lesión o daño irreparable. (1)

La búsqueda de técnicas alternativas llevó a este investigador a desarrollar el método de HET-CAM, ya que con ello no se utiliza animales de experimentación; ya no es in vivo sino in vitro; es simple, rápida y segura, además que los resultados obtenidos pueden reproducirse y la técnica validarse por los laboratorios que empleen este método. Este test de irritación ocular o HET-CAM, en Europa, se usa para evaluar la actividad de activos que van a tener actividad cosmética. La técnica es muy sencilla, pues a la membrana corioalantoidea, que asemeja una zona vascularizada con numerosos vasos y venas, se agrega el activo de estudio, tomándose el tiempo de aparición de efectos a evaluar como son: lisis, coagulación, hemorragia. Las apariciones de estos parámetros en función al tiempo indican que el activo puede ser irritante. (2)

Actualmente, la implementación de técnicas en la cual no se utilicen animales de experimentación son muy demandadas por la sociedad científica, la aparición de las tres “erres RRR Rusell y Burch: reducción,

refinamiento y reemplazo” son una búsqueda creciente por los investigadores. En la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, se fomenta el desarrollo científico de métodos que contribuyan a reducir la utilización de animales de experimentación en las pruebas toxicológicas. Estas evidencias permitirán que los laboratorios que emplean pruebas en animales puedan utilizar esta técnica “el ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (hen’s egg test chorioallantoic membrane, HET-CAM) para evaluar la irritación ocular producida por cosméticos debido a su rapidez, simplicidad, sensibilidad, fácil ejecución y su relativo bajo costo”. (3)

## **1.2 Problemas**

### **1.2.1 Problema general**

¿El gel elaborado a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) presentará un índice de irritabilidad por el método HET-CAM?

### **1.2.2 Problemas específicos**

1. ¿Qué metabolitos secundarios presenta el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) responsables de la posible irritación por el método de HET- CAM?
2. ¿Cuál será el tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0,5 1, 2 y 5% por el método de HET- CAM?

3. ¿Cuál será el tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación del gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0,5 y 1% por el método de HET- CAM?

### **1.3Objetivos**

#### **1.3.1Objetivo general.**

Evaluar el índice de irritabilidad del gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) por el método HET-CAM.

#### **1.3.2Objetivos específicos**

1. Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) como posibles responsables de la irritación por el método de HET- CAM.
2. Determinar el tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5, 1, 2 y 5% por el método de HET- CAM.
3. Determinar el tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación del gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5 y 1% por el método de HET- CAM.



## **1.4 Justificación**

La ejecución de esta investigación forma parte de una serie de trabajos pioneros en nuestro país sobre el empleo de esta técnica novedosa, con lo cual este estudio estaría aportando a nuestro país los nuevos modelos de análisis alternativos para evaluar efectos irritantes sin utilizar animales de experimentación.

La investigación es importante, ya que su empleo proporcionará ventajas potenciales sobre los ensayos in vivo debido a su simplicidad, rapidez; además, condicionan una reducción en el número de animales y una disminución del dolor y el estrés de estos.

Esta investigación es importante porque los resultados obtenidos podrán empoderar a *Phymatosorus grossus* (Calaguala) en los círculo científico fármaco toxicológico debido a su gran potencial terapéutico, haciendo que la industria cosmética mire con interés esta planta, para la elaboración de nuevos e innovadores productos cosméticos a base de estos metabolitos.

Esta información constituye un punto de partida para la realización de futuras investigaciones en el campo del fármaco toxicología y el reemplazo de técnicas invasivas que perjudican al sujeto de experimentación.

## **1.5 Limitaciones metodológicas**

a) La poca información existente sobre el método de HET-CAM por parte de la industria cosmética e industria farmacéutica, por lo que se tuvo que utilizar la información farmacobotánica existente.

b) La dificultad para contar con una incubadora de huevos, por lo que tuvo que diseñarse y construir un equipo que cubra las exigencias del método de HET-CAM

c) La dificultad para ubicar proveedores conocidos de huevos de gallinas fértiles, por lo que fue necesario buscar galpones caseros en varios distritos de Lima, especialmente en los conos donde todavía algunas familias crían animales de corral con fines alimenticios.

d) La poca información en el país sobre el desarrollo del método HET-CAM y la falta de validación del método para desarrollar procesos tan críticos como son la incubación de los huevos, el corte del huevo y la exposición de la membrana corialantoidea.

## **CAPÍTULO II.**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes**

##### **2.1.1 Antecedentes nacionales**

**Taype E. (2015)** desarrolló una variación del método HET CAM aportando importante información científica sobre el empleo de la técnica desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. El objetivo de su ensayo fue si con HET CAM se pudiera evaluar los extractos de 5 frutos nativos del Perú “*Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano)”, ya que la industria cosmética utiliza con regularidad estas frutas alterándolas con otros activos. La metodóloga buscó validar este método, para lo cual este estudio se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (USMP); además, algunos ensayos fueron realizados en las instalaciones de la empresa privada Ingenio Idea SAC. Los resultados evidenciaron que tras la validación de la técnica de Het Cam cuantitativo (CAM-TBS) sobre parámetros de robustez, linealidad, exactitud y precisión, la técnica resultó válida, para la evaluación de la técnica de HET CAM cualitativo, la técnica resultó válida. Se concluye la validación de la técnica de HET CAM cualitativo y cuantitativo, los resultados fueron lineal, exacto y preciso, pero no robusto. (4)

**Churampi L. et al (2015)**, realizaron la evaluación del activo biológico obtenido del extracto de frutos de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano y evaluaron si era seguro para la industria cosmética. El objetivo fue determinar la actividad antiinflamatoria. “utilizando el modelo experimental: edema auricular inducido por TPA y su uso como activo biológico en la industria cosmética a través de

pruebas de seguridad in vitro por el método Irritection Assay System (potencial de irritación dérmica) y el método HET CAM (potencial de irritación ocular)". Después de obtener el extracto, se procedió a realizar la verificación de metabolitos secundarios, encontrando a través de estos ensayos compuestos polifenólicos principalmente flavonoides que son responsables de la capacidad antioxidante y que tiene mucho poder farmacológico. De los extractos preparados, se seleccionó la concentración al 20% con los cuales se prepararon dosis de 500 y 1000 µg. Se concluye que "el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey tumbo serrano" en condiciones experimentales, presenta un ligero potencial irritante; sin embargo, en la calificación general, se le determinó como activo biológico seguro; por lo tanto, se recomienda su uso en la industria cosmética (5).

**Fernández M. et al (2014)**, evaluaron la toxicidad ocular de los colirios de Voriconazol y Fluconazol con HET-CAM Hen s Egg Test-Chorioallantoic Membrane. Este es uno de los pocos estudios que evalúa las características de una formulación farmacéutica colirios de Fluconazol 2 mg/mL y Voriconazol 10 mg/ML, elaborada por los químicos farmacéuticos en el servicio de farmacia Hospital Clínico Universitario de Santiago. La metodología usa la actividad irritante y emplea huevos de gallina fértiles con membrana corioalantoidea y embriones de pollo. El índice de irritabilidad dérmica por el método de Het Cam empleó el tiempo de 300 segundos necesario para la demostración de los efectos (Hemorragia. Lisis, Coagulación) IS, "Irritation Score". Las sustancias de estudio las cuales tienen aplicación sobre el tratamiento de la queratitis fúngica no demostraron IS Irritation Score considerándose que los insumos y activos que se utilizan para preparar estas gotas son seguros eficaces y su utilización no causaría ningún daño a los pacientes (6).

**Inocente M. et al (2013)** evaluaron el efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método Het Cam, obteniendo como resultado que ninguno de los

cosméticos con extracto de camu camu, produjo ruptura de la membrana corioalantoidea en huevos fértiles de gallina. Este desarrollo de la parte experimental se trabajó en la Universidad San Martín Facultad de Medicina (Instituto de investigación) (7).

**Mendoza M. et al (2013)**, evaluaron los componentes químicos de “*Ulomoides dermestoides*” (coleoptera, tenebrionidae) y la capacidad irritante de este extracto. Para ello, fue necesario obtener extractos metanólicos y hexanólicos de la planta completa. Para determinar la composición química de los extractos, la metodóloga usó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y para evaluar la actividad irritante, se usó la técnica del HET CAM en huevos de gallina fértiles y como control de la actividad irritante usó Nimesulida. La cromatografía de gases identificó compuestos aromáticos como “limoneno, los ácidos grasos mirístico, palmítico, esteárico, oleico y linoleico” al profundizar sus análisis hallaron, además, en el extracto Metanólico: “1-pentadecanol, alfa- pineno, beta-Felandreno y alfa-terpineno; en el extracto Hexánico: 2-metil-p-benzoquinona, 2,4-dihidroxi-1-etilbenzeno, 2,5-dimetil-quinona, hidrocarburos saturados e insaturados y alcoholes”. El desarrollo de la prueba de HET CAM en huevos de gallina para determinar potencial irritante evidencio con el extracto metanólico un CAM ( $IR = 3,09 \pm 0,11$ ), similar al observado con el fármaco Nimesulida ( $IR = 2,05 \pm 0,14$ ), el extracto Hexanólico, demostró ser irritante. A la luz de los resultados obtenidos, se puede indicar que el efecto antiirritante de los extractos metanólicos de *Ulomoides dermestoides*, podría atribuirse a compuestos con actividad antiinflamatoria como el ácido oleico y el limoneno. (8)

**González Y. et al (2011)** En el siguiente trabajo de investigación, la finalidad fue evaluar la irritabilidad oftálmica de la *Spirulina platensis* el cual es un producto que será destinado para ser usado en seres humanos por lo cual es necesario la evaluación de su potencial irritante a fin de evitar complicaciones en su administración. Para la evaluación

de la actividad irritante como metodología se eligió la técnica del HET-CAM, la cual emplea una técnica sin uso de animales de experimentación. La técnica innovadora emplea huevos de gallinas fértiles tras 10 días de incubación y en la estructura vascularizada conocida como membrana cori alantoidea, se administró con esta técnica, porque asemeja a la vascularidad del ojo humano: por lo tanto, los resultados son valederos. Tras el desarrollo de la evaluación de la técnica con las muestras problemas, el resultado fue que *Spirulina platensis* presenta inocuidad como insumo activo para la preparación de productos oftálmicos. (9)

### **2.1.2 Antecedentes extranjeros**

**Batista A. (2013)** desarrollo un trabajo cuyo objetivo fue desarrollar un método alternativo para la “evaluación inmunotoxicológica de adyuvantes vacunales usando HET CAM”. Esta investigación evaluó 3 parámetros: el método de irritabilidad o HET-CAM, la evaluación de autoinmunidad y la prueba de antígenos. Además, se evaluó el parámetro de eficacia y toxicidad. Los resultados con HET-CAM realizados para medir el efecto irritante, demostró un bajo nivel de irritación para los antígenos vacunales y proteínas humanas es de gran valor, “pero su alcance para la predicción de autoinmunidad a nivel preclínico es limitado”. (10)

**Rodríguez A. et al (2011)** el siguiente trabajo de investigación determinó la “actividad anti-irritante del extracto etanólico de raíz de *Cnidocolus urens* L”. Para esta determinación, fue necesario elaborar un extracto etanólico. Con el extracto, se realizó la prueba de cromatografía donde se encontraron compuestos como flavonoides y taninos. También se desarrolló el método de actividad irritante por el método de HET-CAM usando el extracto y evaluando la actividad antihemorrágica dando por resultado que posee esta actividad. Se determinó la actividad anticoagulante, demostrando que posee esta actividad, pero no posee

actividad anti-vasodilatadora. El estudio concluye que a una concentración de 10mg/ml el “extracto etanólico de raíz de *C. urens*” posee actividad antiirritante, antihemorrágica y anticoagulante, pero no posee actividad anti-vasodilatadora. (11)

**Murillo J. (2011)** desarrollo un trabajo de investigación en Cuba. Se desarrollaron dos métodos alternativos, la prueba de HET-CAM y el ensayo en animales para la determinación de la actividad irritante ocular. La primera prueba se realizó empleando la membrana cori alantoidea formado en los huevos fértiles de 10 días de incubación; la segunda, en los eritrocitos de ganado bovino. Se evaluaron por este método sustancias como cloruro de benzalconio, lauril sulfato de sodio hidróxido de sodio, polietilenglicol. Los resultados demostraron que en las dos pruebas solo, el propilenglicol resultó ser no irritante. Se concluye que estas pruebas son fáciles de realizar confiables, rápidas y económicas, y que pueden sustituir a las pruebas tradicionales realizadas en conejos (12).

## **2.2 Bases teóricas y/o legales**

### 2.2.1 Normas Nacionales

\* Ley N<sup>o</sup> 30407

Ley de protección y bienestar animal

**Artículo 19.** Centros que utilizan animales en actos de experimentación, investigación y docencia.

“Todo experimento, investigación y docencia con animales solo puede tener lugar en centros de educación superior y centros especializados públicos y privados que cuentan con comités de ética de bienestar animal únicamente cuando los resultados de estas actividades no puedan obtenerse mediante otros métodos que no incluyan animales y garanticen la mayor protección contra el dolor físico”.

“Las medidas de bienestar de animales utilizados en actos de experimentación, investigación y docencia están basadas en las buenas

prácticas de manejo, bioseguridad y bioética de acuerdo con la especie animal, las cuales deben especificarse por el ministerio de agricultura y riego”.

**Artículo 20.** Comité Nacional de ética para el Bienestar Animal.

“El comité nacional de ética para el bienestar animal está conformado por seis integrantes: un representante de la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre del ministerio de agricultura y riego, un representante del ministerio del ambiente, un representante de la autoridad nacional en sanidad agraria, un representante del consejo nacional de ciencia, tecnología e innovación tecnológica (CONCYTEC), un representante del colegio médico veterinario del Perú y un representante del colegio de biólogos del Perú” (13). Es una entidad que se encarga de velar por el bienestar de los animales de experimentación y supervisa a los centros dedicados a la investigación para que realicen una buena práctica basada en el bienestar animal, aplicando criterios recomendados por organismos internacionales a fin de evitar sufrimiento en los animales de experimentación.

Las investigaciones con animales experimentales se realizan en las universidades donde se brinda las carreras de salud (Escuelas médicas, farmacéuticas, etc.). También, existen entidades particulares que brindan estos servicios, pero que tienen que acogerse a la norma. El uso de animales de experimentación es aceptado para pruebas como comportamiento animal, empleo de drogas experimentales, técnicas de trasplantes de órganos, pruebas cosméticas y toxicológicas (14).

Se estima que, en todo el mundo, el número de animales de experimentación bordea los 100 millones. Esta es una cifra bastante importante lo cual lleva a pensar en la búsqueda de nuevas técnicas y métodos alternativos a fin de disminuir esta cifra (15).



Felizmente, el mundo científico ve con buenos ojos el empleo de técnicas alternativas. Muchas empresas dedicadas a la investigación han abandonado ya el uso de animales de experimentación y han tomado otras técnicas para sus evaluaciones. Sin embargo, hay todavía algunos países como China que emplea animales para la evaluación de sus cosméticos (16).

### **2.2.2 CICUALES**

Los Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales (CICUAL- CICUALES) han sido asociados generalmente con grupos de asesores o juntas de expertos que evalúan y dan recomendaciones sobre proyectos de investigación que utilizan animales de laboratorio; sin embargo, en las últimas décadas, se les reconoce más como comités que evalúan la utilización de animales tanto en docencia como en investigación, principalmente por los cambios en la legislación de muchos países, que entienden al animal de laboratorio o animal de experimentación como todo animal que independiente de su clasificación taxonómica, es utilizado como modelo de observación de fenómenos biológicos. Por otra parte, se ha discutido ampliamente de la diferencia entre un comité de bioética y un CICUAL, sus principios y funcionamiento (17).

### **2.2.3 HET-CAM**

El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, Ispra, Italia), valida la técnica HET-CAM la cual ofrece como una sustitución a la prueba clásica de Draize para determinar irritación ocular. Entidades regulatorias de diferentes países han aprobado este método por su capacidad de similitud y predictiva con los métodos tradicionales; además, porque la prueba presenta un bajo costo y una sencilla determinación.

Este ensayo tiene el objetivo de evaluar la capacidad de producir irritación IR (Índice de irritabilidad). Esta prueba desarrollada por Draize, simula la acción de una sustancia sobre el ojo del conejo, empleando

para ello la membrana cori alantoidea de los huevos de gallinas fértiles. La prueba exige aplicar concentraciones definidas y evaluar la acción de las mismas sobre la membrana. La membrana formada en los huevos de gallina es un tejido completo presenta sistema vascular (arterias, venas y capilares) (17).

Al incubar los huevos de gallina, se forma la membrana corioalantoidea la cual es un tejido vascular formado con venas, arterias y capilares lo cual lo hace apropiado para estudiar índice de irritabilidad. Aquí se puede someter las muestras botánicas a observación evitando así el uso de animales de experimentación, principalmente conejos, los cuales son los más utilizados para estas pruebas.

Cuando se utiliza un conejo para medir la irritabilidad de una sustancia, estos productos se aplican directamente al ojo del animal, según el modelo experimental la sustancia puede permanecer hasta 15 horas en el ojo y esto puede causar irritación, úlceras, hemorragia, visión borrosa. El HET-CAM reemplaza el empleo de animales de experimentación (18).

La industria cosmética aun usa la prueba en conejos; sin embargo, el HET-CAM (hen's egg test on chorioallantoic membrane) se desarrolló para sustituir la prueba en animales de experimentación. HETCAM sustituye los métodos tradicionales y es uno de los métodos más rápidos y sencillos para evaluar toxicológicamente el potencial de una sustancia activa para convertirse en formulación farmacéutica (19).

#### **2.2.4 CALAGUALA**

División: Embryophyta

Clase: Polypodiopsida

Orden: Polypodiales

Familia: Polypodiaceae

Género: Phymatosorus

Especie: Phymatosorus grossus  
(langsd. & Fisch.) Brownlie

Nombre popular español: “Calaguala”

Helecho de la familia polipodacea, de rizoma rastrero, escamoso de 9 a 15mm de grosor. Presenta tricomas a todo lo largo de color amarillento, las hojas son de color verde brillante un poco oblongas de 40 a 100 cm de largo y 19-55 cm de ancho. Es considerada una planta primitiva, ya que no desarrolla flores. Es una planta que, en los últimos años, ha alcanzado una preponderancia desde el punto de vista medicinal (19).

Se conocen las siguientes variedades de Calaguala: *Polypodium aureum* L. (*Phlebodium aureum* L.) o *Polypodium decumanum* Willd., entre las cuales existen mínimas diferencias desde el punto de vista botánico. Por su importancia económica y medicinal se tomará como representativa de este grupo a *Polypodium leucotomos* Poir (19).

#### **2.2.4.1 Hábitat**

Esta planta crece en toda América, desde México hasta Bolivia, no es una planta exigente, necesita parajes húmedos y sombreados para su desarrollo, puede crecer sobre musgo, rocas, junto a troncos y palmeras, se la puede encontrar en una altitud de 1,100 a 2,100 msnm (20).

#### **2.2.4.2 Historia**

Las civilizaciones antiguas conocían las bondades de la calaguala. Los pueblos centroamericanos la utilizaban para ceremonias mágicas y chamanísticas. Los pueblos andinos peruanos la llamaban con la voz quechua que significa adorno juvenil, debido al uso ornamental que tiene y lo atractivo de su forma, que les servía para confeccionar trajes con los que bailan en adoración a la tierra.

Willd fue el primer científico que describió al *Polypodium* en 1810 y Horvarth y col. Ellos lograron aislar del rizoma un componente activo denominado calahualina (anapsos) (20).

### **2.2.4.3 Parte utilizada**

La parte utilizada son los rizomas, también pueden utilizarse las hojas. El rizoma se caracteriza por presentar sabor dulce y esto es gracias a la presencia de Osladina, no presenta aroma.

### **2.2.4.4 Composición química**

Presenta metabolitos como: Esteroides: ecdisterona, ecdisonas (una de ellas conocida como polipodoaureína). La  $\alpha$ - ecdisona es un esteroide aislado inicialmente en palomillas de gusanos de seda. También presenta en su composición saponinas: calagualina (heterósido compuesto por glucosa fructosa y una aglicona triterpénica), polipodinas A y B. se ha identificado también la presencia de mucilagos: (desoxihexosa), oleorresina, nitrato de potasio, osladina y almidón.

### **2.2.4.5 Acciones farmacológicas**

Se puede emplear en procesos inmunológicos y autoinmunes. Es útil en artritis reumatoidea, psoriasis, esclerosis múltiple, vitíligo y se ha empleado también en procesos de esclerodermia. Los rizomas de calaguala se emplean debido a su capacidad para incrementar los linfocitos T supresores, los cuales atenúan el curso natural de la enfermedad (20).

“Actividad Inmunológica la estomatitis aftosa recidivante es un proceso que afecta a tejidos mucosos en ocasiones de una alteración o disminución de la inmunidad”. “En estos casos se ha observado en la fase preulcerosa un notable incremento en la población linfocitaria OKT-4 en una proporción 2/1 frente a las OKT-8” (20).

Cuando ocurre la fase ulcerativa, la relación linfocitaria OKT-4/OKT-8 se invierte a 1/10. Durante el proceso de resolución, la relación vuelve a invertirse transformándose en 10/1. “Al respecto, la calagualina demostró en ensayos in vitro, incrementar el número de linfocitos OKT-8, sin alterar la producción de OKT-4 y OKT-3” (20).

Al realizar estudios en pacientes que presentaron estomatitis aftosa la administración de extractos de calaguala en 20 de ellos mejoró la etapa ulcerativa de la enfermedad. Otras pruebas en ratones demostraron que puede utilizarse para prolongar la actividad de los aloinjertos cutáneos en ratones. Además, se han realizado estudios en la cual la calaguala puede ser un tratamiento antitumoral provocando un efecto modulador en la producción y en la liberación de citoquinas sobre las células mononucleares de individuos sanos. Estos estudios se realizaron en Estados Unidos de América en el Instituto Nacional del Cáncer. Por un lado, evidenció un efecto inhibitorio sobre monocitos. “A nivel experimental, se pudo observar que el producto exhibe una actividad antiangiogénica in vivo sobre ratas, a la vez que estimula la proliferación y activación de linfocitos natural killer junto a una inhibición en la producción de TNF-alfa e IL-6” (20).

En los años 60, se presentaron reportes de estudios realizados con la calaguala la cual, a través de la administración de tisanas, se pudo evidenciar su actividad sobre la leucemia linfática (20).

En el campo de la dermatología, los estudios demostraron que el extracto de calaguala se puede emplear en el tratamiento de la psoriasis. Reportes al respecto, han demostrado la efectividad de esta planta a dosis de 80-720mg/día mejoran la estética de la enfermedad. (20).

El extracto acuoso, al ser administrado al paciente con psoriasis provoca un ascenso de los niveles de células CD8+ (linfocitos supresores/citotóxicos) en sangre periférica. Esta puede ser la respuesta por lo cual el extracto acuoso de calaguala es útil en pacientes con psoriasis (20).

“Ensayos clínicos realizados a partir de la administración de Anapsos (extractos del rizoma de calaguala), en forma oral, a razón de cinco cápsulas diarias sobre 36 pacientes portadores de psoriasis, demostraron que el producto produce una regulación del cociente

CD4/CD8, así como de las catequinas alteradas (INF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), en particular en la psoriasis vulgar, psoriasis palmo-plantar y psoriasis invertida, procesos en los cuales estos factores juegan un papel inflamatorio/proliferativo muy acentuado". [A su vez, el producto normalizó la maduración de los queratinocitos hiperactivado. En otro orden de cosas, la administración tanto oral y tópica de un producto que contiene extractos del rizoma de calaguala demostró una inducción melanocítica en pacientes portadores de vitíligo"] (20).

Otros estudios demostraron que la administración de calaguala bajo la forma tópica en pacientes con fotosensibilidad, pueden prevenir las quemaduras de los rayos UV (20).

## **2.3 Hipótesis**

### **2.3.1 Hipótesis general**

El gel elaborado a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) presenta un índice de irritabilidad por el método del HET- CAM.

### **2.3.2 Hipótesis específicas**

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) son los posibles responsables de la irritación por el método de HET- CAM.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5, 1, 2 y 5 % presentan un tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET- CAM.

3. El gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5 y 1% presentan un tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET- CAM.

## 2.4 Operacionalización de Variables

VARIABLES	DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADOR	ESCALA
<b>VI</b> Gel a base del Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Phymatosorus grossus</i> (calaguala)	a.-Identificación Macroscópica	<b>a.- Taxonomía</b>	a.- Ficha Taxonómica	Hoja	SI / NO
	b. fisicoquímica	<b>b.- Solubilidad</b>	b.- Ficha de datos de solventes de diferentes polaridades	Grado de Solubilidad	Muy soluble Soluble Poco soluble Insoluble
	c.- Identificación de Metabolitos secundarios	<b>c.-Metabolitos secundarios</b>	c.- Reactivos	Coloración	Positivo / negativo
	d.-Concentración	Formula	d.- calculo	Diluido Concentrado Saturado	0.5% 1%
<b>VD</b> Índice de irritabilidad	Identificación macroscópica de la membrana corioalantoidea	Lisis Hemorragia Coagulación	Formula de indice de irritabilidad Método de HET-CAM (Índice de irritación)	Tiempo	No irritante Irritante leve Irritante moderado Irritante severo

## **2.5 Definición de términos básicos**

### **Embrión**

Se denomina embrión a un organismo multicelular que se encuentra en las primeras etapas de desarrollo. “En los organismos con reproducción sexual, la fusión de espermatozoides y del huevo en un proceso llamado fertilización, determina la formación de un cigoto, que contiene una combinación de ADN de ambos padres” (22).

“Justo después de su formación, el cigoto comienza un proceso de división, que produce un aumento en el número de células, llamadas blastómeros. Después de que comienza el proceso de diferenciación celular que determinan la formación de los diferentes órganos de acuerdo con un patrón establecido para dar lugar a un cuerpo final.”

“Frente a este proceso de diferenciación celular pueden distinguir tres etapas: la etapa de blastocito, la gastrulación y organogénesis.” Al finalizar el desarrollo embrionario, el organismo resultante se llama feto y completar su crecimiento hasta el momento del nacimiento (21).

### **Incubación**

Es el proceso de incubación de huevos

La incubación es el acto por el que los animales ovíparos (sobre todo las aves) empollan o incuban los huevos sentándose sobre ellos para mantenerlos calientes y así se puedan desarrollar los embriones (22).

### **Irritación aguda**

“Es un estado inflamatorio o una reacción dolorosa del organismo causados principalmente por algún tipo de alergia a agentes químicos o a otros estímulos (pe: el calor o la luz ultravioleta). Se puede sufrir una irritación en diferentes partes del cuerpo: los ojos, la nariz, los intestinos (colon irritable), la piel (23).

### **In vitro**



Técnica controlada de experimentación en un tubo de ensayo y ambiente acondicionado y controlado fuera de un organismo vivo. La fecundación in vitro es un ejemplo ampliamente conocido (24).

### **Membrana corioalantoidea**

“La CAM es una membrana extraembrionaria, originada como una extensión o evaginación del tubo digestivo primitivo del endodermo del embrión de reptiles, aves y mamíferos, situado caudalmente al saco vitelino. Inicialmente el alantoides circula al embrión entre el amnios y el corion.” “Conforme avanza el desarrollo embrionario va disminuyendo de tamaño transformándose en un saco alargado originado en el tallo del cuerpo del embrión y forma parte del cordón umbilical” (25).

### **Prueba de Draize**

En 1944 el toxicólogo John H. Draize y Jacob M. Spines que laboraban en la FDA desarrollaron un método para evaluar el efecto toxico de las sustancias sobre el organismo viviente: el Test de Draize. Esta prueba desarrollo dos métodos para piel y mucosas (26).

### **Índice de irritabilidad**

Es el parámetro demostrativo de la acción de sustancias sobre una estructura orgánica que provoca manifestaciones observables de diferente grado de severidad, que puede ser cuantificable mediante fórmulas matemáticas y que ofrece respuestas para determinar si una sustancia es irritante (26).

### **Het-cam**

Es una alternativa a la prueba del ojo del conejo Draize que imita los cambios vasculares en la membrana corioalantoidea, un análogo de la conjuntiva ocular, que se puede utilizar para determinar la posible irritación de una sustancia de prueba. Este método se basa en el descrito en HET-CAM TEST, INVITTOX PROTOCOL número 47 (1990), ISSN # 0960-2194 (26)

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

### **3.1 Tipo y Diseño de investigación**

El tipo de investigación del presente estudio fue:

Analítico: Debido a que nos permitió analizar los diferentes componentes que presentan los extractos y como estos influyen en la actividad irritante

Experimental: Debido a la introducción y manipulación del extracto para la determinación de la actividad irritante.

Transversal: Debido a que el estudio se realizó en un determinado tiempo. (12-9)

El diseño es Experimental, ya que se trabajó con huevos de gallina fértiles y especies botánicas con actividad terapéutica (12).

### **3.2 Población y muestra**

Para el presente estudio, se adquirió 100 huevos de gallina fértil del galpón “Carmelita” del distrito de Lurín.

La especie vegetal fue recolectada en la provincia de Huaraz departamento de Áncash, se recolectó 5 kilos aproximadamente.

Para la actividad irritante por el método de HET-CAM, se utilizó 60 huevos fértiles de gallinas White Leghorn de tamaño mediano de 50-60g de peso aproximadamente, de color y aspecto uniforme.

Para el extracto hidroalcohólico se seleccionó 300g de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) por sus características organolépticas con las cuales se preparó el extracto hidroalcohólico.

<b>Criterio de inclusión:</b>	<b>Criterio de exclusión</b>
Se consideró todo el Huevo de Gallina fértil	Se rechazó los huevos demasiados pequeños
Se consideró aquellos que tuvieron el Tiempo de incubación apropiada	Se rechazó aquellos que no lograron formar membrana corioalantoidea
Se consideró aquellos huevos que Correctamente formaron la membrana cori alantoidea	Se rechazó aquellos con cámara de aire pequeña

### 3.3 Equipos, materiales y reactivos

Materiales para la elaboración del extracto hidroalcohólico:

Materiales	Especificación	Marca
Placas Petri	200x15 mm	BOHECO <sup>R</sup>
Tubos de ensayo	16x150 mm	PIREX <sup>R</sup>
Gradilla de metal para	12 tubos	HEATHROW SCIENTIFIC <sup>R</sup>
Pipetas	5 cc	MARIENFELD <sup>R</sup>
Gotero Pasteur	plástico	
Frascos de boca ancha	500 ml	PIREX <sup>R</sup>
Fiolas	25 cc	BOHECO <sup>R</sup>
Buretas	25 cc	BOHECO <sup>R</sup>
Frascos goteros		
Embudo chico	50 ml	CMF <sup>R</sup>
Papel filtro	paso lento	BOHECO <sup>R</sup>

#### 3.3.1 Equipos utilizados para la elaboración del extracto hidroalcohólico

Equipos	Marca
Equipo de filtración	NEMMET <sup>R</sup>
Estufa desecadora	NEMMET <sup>R</sup>
Desecador	NEMMET <sup>R</sup>
Balanza analítica	SARTORIUS <sup>R</sup>
Lámpara ultravioleta	ZEIZZ <sup>R</sup>

### 3.3.2 Reactivos usados para la marcha fitoquímica

Reactivos
Solventes (etanol 96%)
Cloruro férrico
Reactivo de shinoda
Reactivo de fheling
Reactivo de fheling
Reactivo de hidróxido de sodio
Reacción de Boruträger
Reactivo de Dragendorff.
Reactivo de Mayer
Hidroxido de sodio
Lauril sulfato
Agua destilada

### 3.3.3 Reactivos usados para la prueba de solubilidad

Solventes
etanol 96%
Éter etílico
Butanol
Metanol
Hexano
Cloroformo
Acetato de etilo

### 3.3.4 Materiales usados en la elaboración del gel:

Materiales
Beacker de 500 ml
Probeta de 100 cc
Bagueta de vidrio
Balanza semianalitica
Frascos de vidrio de boca ancha

### 3.3.5 Reactivos usados para la elaboración del gel:

Reactivos
Carbapol 940
Trietanolamina
Parabenos
Agua destilada

### 3.3.6 Materiales usados para la actividad irritante Het-Cam

Materiales
Ovoscopio
Linterna
Pinza para romper huevos
Lupa
Cronometro

## 3.4 Procedimientos

Colección de la planta:

Se realizó en la provincia de Huaraz departamento de Áncash. Se recolectaron helechos jóvenes de 11 meses de edad y de 40 a 50 cm de altura. Después de la recolección de la planta, se secó a temperatura ambiente por 5 días, luego se trituró.

Clasificación taxonómica:

Se determinó por el Mg. Asunción A. Cano Echevarría Jefe del herbario del Museo de la Historia Natural de la UNMS. Para la evaluación taxonómica se presentó una planta entera (raíz, tallo y hojas) a solicitud del taxónomo.

Preparación del extracto:

El solvente se preparó a partir de alcohol absoluto, para un litro de solución fue necesario medir 960 ml de alcohol absoluto y agregar 40 ml

de agua destilada. Las hojas de la calaguala que fueron trituradas, fueron pesadas en una balanza semianalitica, se pesó 300 g de la muestra y se colocó en una botella de vidrio de boca ancha y se adicionó el alcohol al 96°. Se tapó el envase y se dejó que se desarrolle el proceso extractivo por 8 días, agitando mañana y noche durante todo ese tiempo. Una vez concluido ese tiempo se filtró y se dejó secar a 40°C en una estufa de aire circulante hasta peso continuo y así se obtuvo el extracto seco. El extracto seco fue recogido y acondicionado en un envase ámbar pequeño hasta su posterior uso. El rendimiento fue de 25 g.

#### Elaboración del gel:

Para la elaboración del gel fue necesario disolver 2 gramos de carbapol, en 100ml de agua destilada. La disolución se realizó en un beacker con ayuda de una bagueta de vidrio. Una vez disuelta el carbapol se agregó la trietanolamina gota a gota hasta obtener una consistencia semirrígida finalmente se le agrego parabenos para mejorar su estado de conservación. El producto obtenido fue envasado en potes de plástico hasta su posterior uso. Para la preparación del gel a base del extracto hidroalcohólico de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) a la concentración al 1% se utilizó un beacker y se pesó 1 g de extracto y 99 g de gel p/p, se homogenizo hasta disolución total y luego se envaso y rotulo, y para la concentración al 0.5% se utilizó 0,5 g y 99.5 g del gel, siguiendo el mismo procedimiento.

**Prueba de solubilidad:** después se realizó el ensayo de solubilidad, se expuso la muestra a solventes de polaridad diferentes para obtener el más apropiado (30)

### **Tamizaje fitoquímico:**

El tamizaje fitoquímico se realizó con el objetivo de determinar la presencia de determinados metabolitos secundarios.

Se desarrolló los siguientes ensayos:

#### a) Identificación de taninos

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar y se agregó 3 gotas del reactivo de gelatina-cloruro de sodio. Se centrifugó: Un precipitado de color blanco en el fondo del tubo de ensayo confirmó la presencia de taninos.

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó 20 gotas de  $\text{FeCl}_3$ , los resultados demostraran: Acido pirogálico, si presenta coloración azulada, catequinas, si presenta color verde (27).

#### b) Identificación de flavonoides

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Shinoda. Una coloración naranja indica resultado positivo, para elaborar el reactivo, se usó limadura de magnesio y ácido clorhídrico concentrado (27)

#### c) Identificación de cumarinas

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de NaOH 10 %. Una coloración amarillenta sometida a la luz Uv 365nm indica resultado positivo (27).

#### d) Identificación de quinonas

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de quininas (etanol y NaOH al 5%) Una coloración amarilla es positiva (27).

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Bornträger. Una coloración rosada a roja demostrará la presencia de antraquinonas (27)

e) Identificación de alcaloides

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Dragendorff. La presencia de un precipitado naranja a rojo demostrará una reacción positiva (28).

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Mayer. La presencia de un precipitado blanco o crema demostrará una reacción positiva (28).

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Bertrand. La presencia de un precipitado blanco demostrará una reacción positiva (28).

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Sonnenschein. La presencia de un precipitado amarillo verdoso demostrará una reacción positiva (28).

f) Identificación de Carbohidratos

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Molish. La presencia de un anillo violáceo demostrará una reacción positiva (28).

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Antrona. La presencia de una coloración verde demostrará una reacción positiva (28).

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Fehling A y B. calentar en Baño María. La presencia de una coloración rojo ladrillo demostrará una reacción positiva (28).

g) Identificación de Aminoácidos libres y grupos amino

Se tomó una pequeña cantidad de muestra a analizar, y se agregó el reactivo de Ninhidrina. La presencia de una coloración violeta demostrará una reacción positiva (28).



#### h) Identificación de esteroides

Se tomó una pequeña cantidad de muestra a analizar, y se agregó el reactivo de Lieberman- Burchard. La presencia de un color verde azulado indicara esteroides, mientras que la presencia de una coloración rojo naranja indicara triterpenoides (28).

#### i) Identificación de Saponinas

Se tomó una pequeña cantidad de muestra a analizar, y se agregó el reactivo de agua destilada. Se agitó enérgicamente por 1 minuto. La presencia de espuma indicará reacción positiva (28).

#### j) Identificación de Glicósidos

Se tomó una pequeña cantidad de muestra para analizar, y se agregó el reactivo de Baljet. La presencia de una coloración anaranjada, indicará reacción positiva (28).

### **Procedimiento HET-CAM**

Para la realización de este procedimiento, se emplearon huevos embrionados de gallinas de la raza White Leghorn, con un peso entre 50 - 60 g. Para el lavado de los huevos, se utilizó agua destilada, como controles se utilizó NaCl al 0,9% como control negativo y NaOH a 0,1 N y SDS (dodecil sulfato de sodio) al 1% como controles positivos.

Para romper la cáscara por la cámara de aire se empleó tijeras y pinzas de acero inoxidable. Para observar el desarrollo embrionario, fue necesario emplear un ovoscopio. Para medir el tiempo de índice de irritabilidad, se usó un cronometro. Se emplearon también beacker pipetas pasteur y bandejas para desechar los resultados. Los huevos fueron colocados en la incubadora, y se mantuvo a una temperatura de  $37,5 \pm 0,5$  °C, y una humedad relativa de  $62,5 \pm 7,5\%$ , con la cámara de aire hacia arriba y sin rotar hasta que alcanzaron los 09 días de incubación.

El crecimiento embrionario fue revisado con el ovoscopio y se determinó la viabilidad del huevo. Aquellos huevos que demostraron crecimiento embrionario irregular fueron desechados por defectuosos. Los huevos viables fueron marcados en la zona de la cámara de aire donde se procedió a romperlos con ayuda de la tijera y extraer la cáscara con la pinza. Al retirar la cáscara se observó la presencia de una membrana blanca la cual fue hidratada con cloruro de sodio y posteriormente retirada con la pinza. Luego los huevos ya abiertos fueron regresados a la incubadora para evitar su enfriamiento.

Para determinar el índice de irritabilidad, se determinó el tiempo (s) en la cual aparecen las reacciones de hemorragia, lisis (desintegración de los vasos) y coagulación (desnaturalización de las proteínas intra y extravasculares), en un intervalo de 5 minutos y se registró el tiempo en segundos en que aparece, posteriormente se calcula el índice de irritación (I.I.) a través de la fórmula siguiente:

$$I.I = (301 - \text{seg H} / 300) 5 + (301 - \text{seg L} / 300) 7 + (301 - \text{seg C}) / 300) 9$$

Dónde:

H = Hemorragia

L = Lisis de los vasos

C = Coagulación

Seg = El tiempo en segundos en que aparece cada reacción

Se determinó el I.I. (Índice de Irritabilidad) para 2 huevos con el sodio dodecil sulfato (SDS) al 1% y 2 huevos con NaOH 0,1 N. Estas dos fueron las sustancias de referencia que constituyen los controles positivos que recoge el protocolo y que se utilizaron para el montaje de la técnica. (31)

Para evaluar el efecto irritante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala), se prepararon diluciones al 5, 2, 1 y 0.5% de concentración, se administró 0.2 ml de estas diluciones y con

ayuda de una pipeta Pasteur, se colocó a cada huevo sobre la MCA (Membrana corioalantoide) directamente cubriendo no menos de la mitad de su superficie.

Asimismo, los geles al 0.5% y 1% elaborados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala), también fueron administrados sobre la membrana corioalantoidea en sus grupos correspondiente, el preparado administrado fue de 0.2ml y se esperó 5 minutos para evidenciar el resultado.

De igual forma se administró las mismas cantidades de gel puro (gel base) a un grupo de huevos para visualizar el índice de irritabilidad.

#### Clasificación

Se evaluó la severidad de las tres reacciones posibles (lisis, hemorragia y coagulación) a los 5 min de aplicadas las sustancias de ensayo, clasificándose de acuerdo con la siguiente escala de HET-CAM

Rango HET CAM	Categoría irritante
0,0 – 0,9	No irritante
1,0 – 4,9	irritante leve
5,0 – 8,9	irritante moderado
9,0 – 21,0	irritante severo

Si se observa alguna reacción de escala 3 en cualesquiera de los tres tipos de reacciones, entonces se repite el ensayo utilizando otros tres huevos embrionados, pero con un tiempo de exposición del producto de 1 min y se reevalúa la reacción obtenida, utilizando la misma escala. La evaluación final de la magnitud de irritabilidad se asigna atendiendo a la puntuación más alta obtenida en tres réplicas. (29) (31)

### **3.5 Procesamiento de datos**

Los datos fueron recolectados en fichas elaborados por los investigadores. Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se tomó el tiempo y se compararon el grado de irritación.

El análisis estadístico se realizó utilizando el Software SPSS v20. Se utilizó las pruebas como media aritmética. Para establecer si hubo diferencias de los grados de irritabilidad, se utilizó la prueba de Anova.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1 Presentación: Resultados parciales

**Tabla N°1: Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico *Phymatosorus grossus* (Calaguala)**

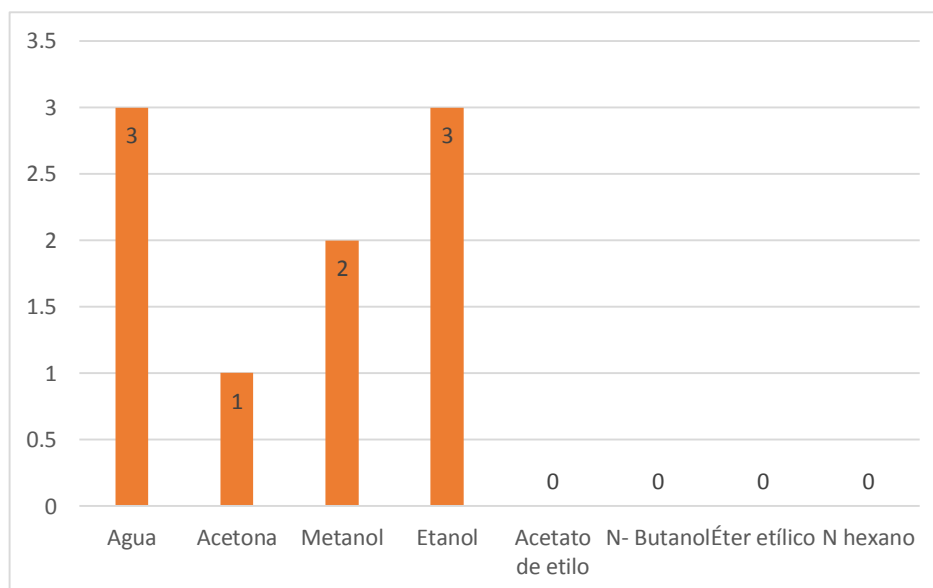
Reactivos	hojas
Agua	+++
Acetona	+
Metanol	++
Etanol	+++
Acetato de etilo	0
N- Butanol	0
Éter etílico	0
N hexano	0

**Fuente:** elaboración propia, 2018

**Leyenda:** muy soluble (+++), soluble (++) , poco soluble (+), insoluble (0)

El extracto hidroalcohólico *Phymatosorus grossus* (Calaguala), evidencio ser muy soluble en agua y etanol, soluble en metanol y poco soluble en acetona.

**Grafico N° 1: Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico *Phymatosorus grossus* (Calaguala)**



El desarrollo de la prueba en solventes de diferentes polaridades, se demostró que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) posee una alta solubilidad en agua y etanol (solventes polares)

**Tabla N°2: Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)**

METABOLITO SECUNDARIO	REACCIÓN	RESULTADO
CARACTERIZACION DE CARBOHIDRATOS	Emplear el reactivo de Molish	<b>0</b>
	Emplear el reactivo de Antrona	<b>0</b>
	Emplear el reactivo de Fehling	<b>0</b>
CARACTERIZACION DE COMPUESTOS FENÓLICOS	Emplear el reactivo de FeCl <sub>3</sub>	<b>0</b>
CARACTERIZACION DE TANINOS	Emplear el reactivo de Gelatina	<b>0</b>
CARACTERIZACION DE FLAVONOIDES	Emplear el reactivo de Shinoda	<b>++</b>
CARACTERIZACION DE ANTOCIANINAS Y FLAVONOIDES CATÉQUICOS	Emplear el reactivo de Rosenheim	<b>0</b>
CARACTERIZACION DE AMINOÁCIDOS LIBRES Y GRUPOS AMINO	Emplear el reactivo de Ninhidrina(0.1% en etanol)	<b>0</b>
<b>CARACTERIZACION DE ALCALOIDES</b>	Emplear el reactivo de Dragendorf	<b>++</b>
	Emplear el reactivo de Mayer	<b>+</b>
	Emplear el reactivo de Bertrand	<b>+</b>
	Emplear el reactivo de Sonnenschein	<b>+</b>
CARACTERIZACION DE NAFTAQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y ANTRANONAS	Emplear el reactivo de Borntrager	<b>+</b>
CARACTERIZACION DE TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Emplear el reactivo de Lieberman-Burchard	<b>0</b>
CARACTERIZACION DE SAPONINAS	Emplear el reactivo de Generación de espuma	<b>+</b>
CARACTERIZACION DE GLICÓSIDOS	Emplear el reactivo de Baljet	<b>++</b>
CARACTERIZACION DE CUMARINAS	Emplear el reactivo de NH <sub>4</sub> OH cc ó NaOH 10%	<b>0</b>

**Fuente: elaboración propia, 2018**

**Leyenda:** muy abundante (+++), abundante (++) , poco abundante (+), nulo (0)  
 Se observa que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala), si presenta metabolitos secundarios que generan irritabilidad. Estos son: flavonoides, alcaloides, antraquinonas, saponinas y glicosidos.

**Tabla 3: Soluciones de los controles para evaluación del método HET- CAM**

CONTROL	TIPO DE CONTROL	TIEMPO	REACCION	(SEGUNDOS)	INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
SUERO FISIOLÓGICO	BLANCO	301	301	301	0	NO IRRITANTE
LAURIL SULFATO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 1	301	118	148	8.86	IRRITANTE MODERADO
HIDROXIDO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 2	168	105	145	11.47	IRRITANTE SEVERO
ETANOL	SOLVENTE USADO	197	245	278	3.73	IRRITANTE LEVE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

**Fuente: HET-CAM test, invitox protocolo N°47 (1990)**

En la tabla N°3 se evidencia, que los productos usados como control sobre la MCA mostraron lesiones al aplicarse Lauril sulfato de sodio (Irritante moderado), hidróxido de sodio (irritante severo) y etanol (irritante leve), no fue así en el caso del cloruro de sodio.

**Tabla 4: índice de irritabilidad por el método HET – CAM del Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)**

Extracto hidroalcohólico	Concentración	TIEMPO	REACCION	(SEGUNDOS)	INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
Hoja	5%	168	148	178	9,48	IRRITANTE SEVERO
Hoja	2%	178	158	188	8,78	IRRITANTE MODERADO
Hoja	1%	198	218	248	5,25	IRRITANTE MODERADO
Hoja	0,5%	208	288	278	2,54	IRRITANTE LEVE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

**Fuente: HET-CAM test, invittox protocol N°47 (1990)**

En la tabla N°4 se evidencia, que extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala), a través del método del HET-CAM a mayor concentración, expresa un índice de irritabilidad severo y a menor concentración, un índice de irritabilidad leve.

**Tabla 5: Índice de irritabilidad por el método HET – CAM del Gel de Carbapol, Trietanolamina y agua**

Forma farmacéutica	Concentración	TIEMPO REACCION (SEGUNDOS)			INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
Gel base	100%	301	301	301	0	NO IRRITANTE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

**Fuente: elaboración propia, 2018**

En la tabla N°5 se demostró por el método de HET-CAM, que el gel base, elaborado con el polímero gelificante carbapol y el agente gelificante trietanolamina son no irritantes y pueden usarse como vehículo para el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)

**Tabla 6: Resultados del método HET – CAM GEL con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)**

Formas farmaceuta	Concentración	TIEMPO REACCION (SEGUNDOS)			INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
Gel a base del extracto hidroalcohólico	1%	200	209	230	5.96	IRRITANTE MODERADO
Gel a base del extracto hidroalcohólico	0,5%	280	289	290	0.96	NO IRRITANTE



LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

**Fuente: HET-CAM test, invitox protocol N°47 (1990)**

En la tabla N° 6 los resultados del método HET-CAM del gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala), demostró a la concentración de 1% ser irritante moderado y a la concentración de 0.5% ser no irritante.

## 4.2 Contrastación de Hipótesis

### Hipótesis general

El gel elaborado a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) presenta un índice de irritabilidad por el método del HET- CAM.

H0= El gel elaborado a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) presenta un índice de irritabilidad alto por el método del HET- CAM.

H1= El gel elaborado a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) presenta un índice de irritabilidad bajo por el método del HET- CAM.

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P-valor
Factor	41,012	7	8,721	1791,333	,000
Error	,176	36	,005		
Total	41,106	43			

**Interpretación:** En la tabla se presenta la salida del SPSS para la prueba ANOVA, dado que el p valor es menor a 0.05 se puede afirmar que existe al menos un producto en gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) con índice de irritación bajo al ser comparado con el extracto puro.

**Decisión:** Se descarta la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1). El gel elaborado a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) presenta un índice de irritabilidad bajo al ser evaluado por el método del HET- CAM

### Hipótesis específicas 1

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) son los posibles responsables de la irritación por el método de HET-CAM.

H0= Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) no son los posibles responsables de la irritación por el método de HET-CAM

H1= Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) si son los posibles responsables de la irritación por el método de HET-CAM.

METABOLITO	RESULTADO
Flavonoides	++
Alcaloides	++
Antraquinonas	+
Saponinas	+
Glicosidos	++

**Interpretación:** en la evaluación fitoquímica se determinó la presencia de metabolitos secundarios con diferentes grupos químicos, entre ellos las saponinas, los principales compuestos causantes de irritación dermal y oftálmica tal como lo documenta Jean L. Bolognia, Julie V. Schaffer, Lorenzo Cerroni en la cuarta edición de la revista de dermatología "Elsevier Health Sciences" publicada el 23 noviembre del 2018

**Decisión:** Se descarta la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1). Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) si son los posibles responsables de la irritación al ser evaluados por el método de HET-CAM

## Hipótesis específicas 2

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5, 1, 2 y 5 % presentan un tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET- CAM.

H0= El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5, 1, 2 y 5 % no presentan un tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET- CAM.

H1= El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5, 1, 2 y 5 % si presentan un tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET- CAM.

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	P-valor
Inter grupo	30.012	7	8.721	179.333	.000
Inter grupo	35.176	36	7.705	171.555	.000
Inter grupo	31.106	35	9.876	173.888	.000
Inter grupo	30.005	30	6.567	169.200	.000
Total	.6299	108			

**Interpretación:** En la tabla se presenta la salida del SPSS para la prueba ANOVA, dado que el p valor es menor a 0.05 para cada grupo evaluado, se puede afirmar que las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) presentan diferentes tiempos de reacción sobre la membrana corioalantoidea al ser evaluado por el método de HET-CAM

**Decisión:** como el p-valor es menor a 0.05 se puede afirmar que las concentraciones tienden a provocar irritación al ser evaluadas por el método de HET-CAM, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna. Se descarta la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1). El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5, 1, 2 y 5 % si presentan un tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación al ser evaluado con el método de HET- CAM.

### Hipótesis específicas 3

El gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5 y 1% presentan un tiempo de reacciones de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET-CAM.

H0= El gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5 y 1% no presentan un tiempo de reacciones de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET-CAM.

H1= El gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5 y 1% si presentan un tiempo de reacciones de hemorragia, lisis y coagulación por el método de HET-CAM.

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P-valor
Inter grupo	0.00430	8	0.0002127	1.212	,005
Inter grupo	0.32268	2	0.03666230	209.78	,005
	0.32698	10			

**Interpretación:** En la tabla se presenta la salida del SPSS para la prueba ANOVA, dado que el p valor es mayor a 0.05 se puede afirmar que gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) no presentan un tiempo de irritación (hemorragia, lisis y coagulación) al ser evaluado con el método de HET-CAM.

**Decisión:** Se descarta la hipótesis alterna (H1) y se acepta la hipótesis nula (H0). El gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5 y 1% no presentan un tiempo de reacciones de hemorragia, lisis y coagulación al ser evaluado con el método de HET- CAM.

### 4.3 Discusión

Al realizar la marcha fitoquímica, se pudo determinar metabolitos secundarios presente en el extracto hidroalcohólico *Phymatosorus grossus* (Calaguala), estos metabolitos hallados también se encontraron en el trabajo realizado por Rodríguez et al, quien evaluó la actividad antiirritante del extracto etanólico de la raíz de *Cnidoscolus urens* L. obteniendo flavonoides como principal compuesto que evita la irritación. Sin embargo, al contrastar con la información proporcionada por Jean L. Bologna, Julie V. Schaffer, Lorenzo Cerroni en la revista de dermatología "Elsevier Health Sciences", se pudo determinar que las saponinas son responsables del efecto irritante.

Según los resultados, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) a diferentes concentraciones, si produce una irritabilidad sobre la membrana corialantoidea, estos resultados difieren a los reportados por Rodríguez y Martínez en Colombia 2011 quienes realizaron la determinación de la actividad antiirritante del extracto etanólico de la raíz de *Cnidoscolus urens* L. concluyendo que el extracto etanólico de la raíz de *Cnidoscolus urens* posee actividad antiirritante, antihemorrágica y anticoagulante. También los resultados difieren con los de Churampi López y Montes Manrique en el 2015, quienes al evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey tumbo serrano concluyeron que posee actividad antiinflamatoria y seguridad como activo biológico. Esta diferencia se debe a la ausencia de saponina en los productos estudiados por los otros investigadores.

Cuando se emplea el gel a la concentración de 0.5 y 1%, el preparado no produce irritación lo que hace presumir que la base de gel, actúa como un neutralizante por lo cual se reduce la irritación. Estos resultados son muy similares a los hallados por Inocente M. et al quien evaluó el gel de una formulación cosmética con camu camu y los resultados fueron también no irritante.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

1.- Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) fueron: flavonoides, alcaloides, antraquinonas, saponinas y glicósidos, siendo las saponinas los responsables de proporcionar irritabilidad sobre la membrana corioalantoidea.

2.- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5, 1, 2 y 5% presentan tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación, responsables del índice de irritabilidad leve, moderado y severo.

3.- El gel elaborado a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) al 0.5 y 1% presentan tiempo de reacción de hemorragia, lisis y coagulación; teniendo un índice irritación de 0,96 y 5,96 respectivamente; siendo el primero clasificado como no irritante.

## 5.2 Recomendaciones

Continuar estudios de irritabilidad de gel a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala) que confirmen nuestros resultados, utilizando otros métodos y/o modelos experimentales alternativos.

Evaluar el potencial terapéutico de otras especies biológicas por el método de HET CAM afín de contar con más productos con valor agregado para interesar a la industria farmacéutica y cosmética a realizar estudios más profundos sobre diferentes actividades farmacológica.

Proponer la validación del método para que los resultados puedan reproducirse y poder emplearse con otras especies botánicas.

Aplicar el método de HET-CAM en las diferentes formulaciones que se preparan en las oficinas farmacéuticas intra y extra hospitalarias.

## REFERENCIAS

1. Bruner LH, Shaddock JA, Essex-Sorlie D. Alternative methods for assessing the effects of chemical on the eye. *Dermal and Ocular Toxicology. Fundamental and Methods*, New York: CRC Press Inc; 1991:585-608
2. Balls M, Bothan PA, Spielmann H. The EC (European Comision)/HO (British Home Office) International calidation study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. *Toxicol In Vitro*; 1995;9(6):871-29.
3. Álvarez FH, Zarate OR, Gorriti GA, Jurado TB. Manual de Farmacognosia y Productos Naturales Terapéuticos. Fac. F y B de la UNMSM; 1989; (1): 37-38
4. Taype E, “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética” Tesis para optar el Título Profesional de Químico-Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Lima-Perú 2015.
5. Churampi L, “Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey (tumbo serrano) y su uso como activo biológico en industria cosmética” Editorial: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.2015.
6. Fernández, M, “Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de Voriconazol y Fluconazol con HET-CAM” *Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*, ISSN 1130-6343, Vol. 38, Nº. 4, 2014, págs. 300-304.
7. Inocente, M. “Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de Camu Camu, mediante el método Het Cam”. *Revista Horizonte Medico. Facultad de Medicina de la Universidad San Martin de Porres*. 2013; 13 (2).



8. Mendoza M. "Composición química y capacidad anti-irritante de extractos de cuerpo entero de *Ulomoides dermestoides* (coleoptera, tenebrionidae)". *Revista Cielo*. 2013, vol.20, n.1, pp.41-48. ISSN 0121-4004.
9. González Y. "Evaluación de la irritabilidad oftálmica de la *Spirulina platensis* por un método Het Cam". Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Medicas (2011)
10. Batista A. "Métodos alternativos para la evaluación inmunotoxicológica de adyuvantes vacunales". Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias médicas. Universidad de ciencias médicas Santiago de Cuba. 2012
11. Rodríguez A. "Determinación de la actividad anti-irritante del extracto etanólico de raíz de *Cnidioscolus urens* L". Tesis para optar el grado de Químico farmacéutico. Universidad del atlántico. Colombia 2011.
12. Murillo G, Pérez U, Tur E, Vinardell MP, García G, Pascual JR. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. *Revista Toxicol* 20:187-92. 2011.
13. Ley 30407 "Ley de Protección y Bienestar Animal en el Perú". *Rev Inv Vet Perú* 2016; 27(2): 388-396 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11664>.
14. Grayson, L., *Animals in Research: For and Against* (Londres: British Library, 2000), p. 204.
15. See Taylor, K.; Gordon, N.; Langley, G. & Higgins, W. (2008) "Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005", *Alternatives to Laboratory Animals*, 36, pp. 327-342 [referencia: 11 de abril de 2013]
16. Garthoff, B. (2005) "Alternatives to animal experimentation: The regulatory background", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, pp. 388-392.

17. <http://www.fcm.uncu.edu.ar/joomla/index.php/investigacion/cicual/581-comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-de-laboratorio>
18. Wilhelmus, K. R. (2001) "The Draize eye test", Survey of Ophthalmology, 45, pp. 493-515
19. LIM S.A Laboratorio de investigación y análisis Jordi Martí S.A: Avinguda del Carrilet, 353 1ª planta C. 'Hospitalet de Llobregat Provincia: Barcelona País: España
20. Wren, R.C. 1994. Enciclopedia de Medicina Herbolaria y Preparados Botánicos. Editorial Grijalbo. San Miguel. México. pp. 233-234.
21. Gola, G., Negri, G. y Cappeletti, C. 1965. Tratado de Botánica. 2.ª edición. Editorial Labor S.A., Barcelona, 1110 p
22. Marchi, G., Chiozzi, G., Fasola, M. (2008). «Solar incubation cuts down parental care in a burrow nesting tropical shorebird, the crab plover *Dromas ardeola*». Journal of Avian Biology (en inglés) 39 (5): 484-486
23. Fluhr JW, R Darlenski, Angelov Y Fischer, Tsankov N, Sr. Baskette (2008). «irritación de la piel y sensibilización: Mecanismos y nuevos enfoques para la evaluación de riesgos. 1. Irritación de la piel». piel Physiol Pharmacol. 21. pp. 124-135.
24. Real Academia Española y Asociación de Academias de la Lengua Española (2005). «in vitro». Diccionario panhispánico de dudas (1.ª edición). Consultado el 13 de marzo de 2011.
25. Wolfert, P. Couscous and Other Good Food from Morocco, Harper & Row, 1973.
26. Pappa E, Guardado A. Métodos alternativos, Revista Toxicol. 1999; 16: 145.
27. Lock de ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial de la Universidad Católica del Perú. Lima. 1994.

28. Moncayo S. "Determinación preliminar de fitoconstituyentes presentes en las hojas de *Rumex crispus* L. (lengua de vaca) procedente del distrito de Otuzco La Libertad". 2012.
29. Animals in Product Testing, National Anti-Vivisection Society, consultado el 29 de junio de 2009
30. Method Domínguez, 1973) Métodos de investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, México, pág. 229-237
31. Lüpke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem Toxic* 1985; 23: 287-291.

## ANEXOS

**FIGURA 1** Recolección de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)



**FIGURA 2** Selección de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)



**FIGURA 3** Pesaje de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)



**FIGURA 4** Trozado de hojas de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)



**FIGURA 5** Hojas maceración de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)







**FIGURA 6** Hojas filtrado de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)







**FIGURA 7** Extracto seco de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)



**FIGURA 8** Prueba de solubilidad de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)





FIGURA 9 Marcha fitoquímica de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)





**FIGURA 10** Prueba de HET CAM con el extracto de

- Incubadora artesanal para el HET CAM

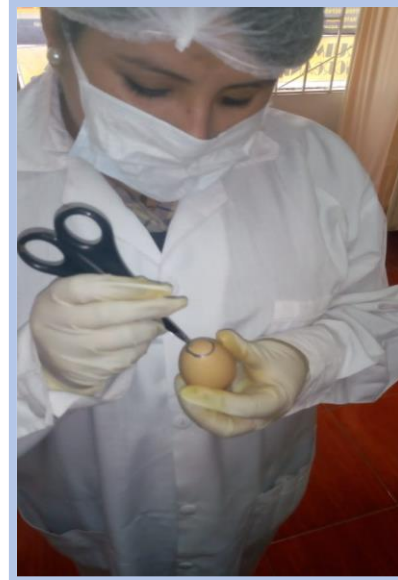


**FIGURA 11** Ovoscopio artesanal para el HET CAM

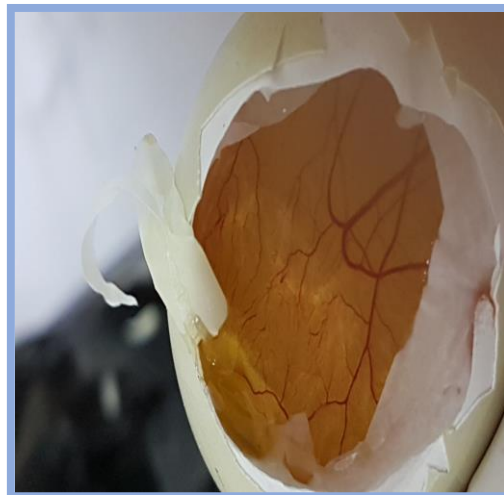




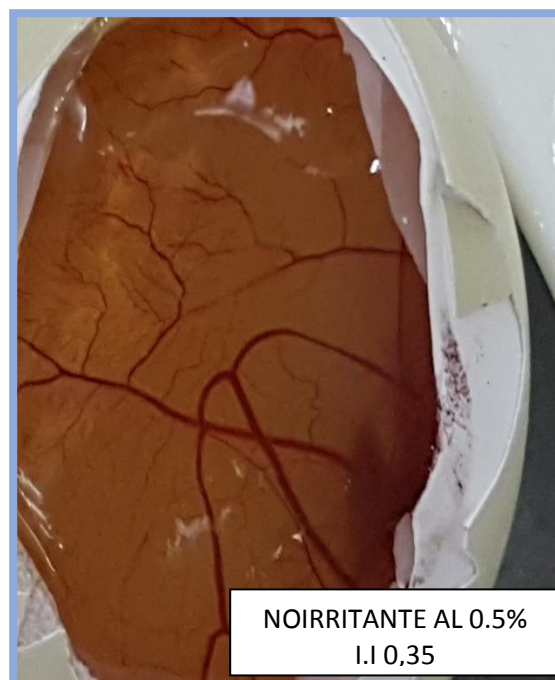
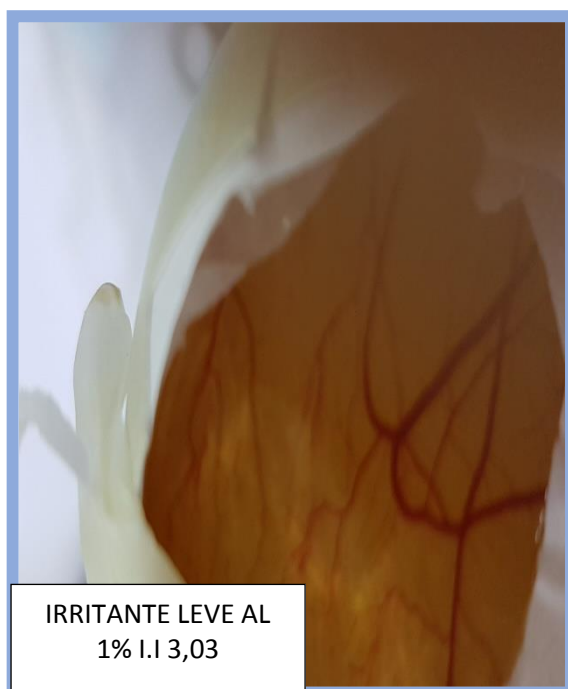
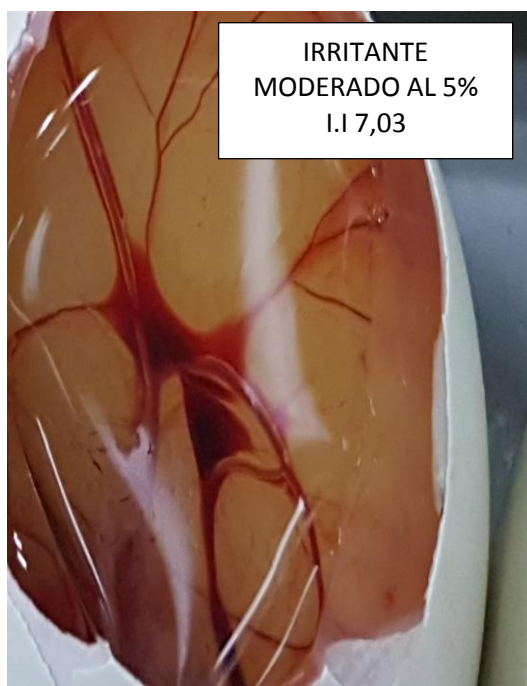
**FIGURA 12** Señalización de la cámara de aire para romper el huevo



**FIGURA 13** Ruptura de la cascara de la cámara de aire del huevo



**FIGURA 14** Procedimiento de HET-CAM del extracto hidroalcohólico de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)



**FIGURA 15** Procedimiento de HET CAM del extracto hidroalcohólico de *Phymatosorus grossus* (Calaguala)

