

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

PERFIL DE SEGURIDAD DE LAS FORMULACIONES MAGISTRALES
TOPICAS ELABORADAS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
LAS HOJAS SECAS DE *Melissa officinalis* L. (TORONJIL) MEDIANTE
EL MÉTODO HET-CAM.

Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico

TESISTA:

Bach. ANGULO BORBOR DANNY ALONSO

Bach DIONISIO VALENCIA ANDIRA VICTORIA

ASESOR: Mg. Q.F FLORES LOPEZ OSCAR BERNUY

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

Para mi hermosa familia, no podría sentirme más feliz con la confianza brindada sobre mi persona, y más aun con haber terminado con éxito un proyecto más en mi vida.

Por eso quisiera dedicar esta tesis a ustedes que son el más grande tesoro y regalo que la vida me pudo dar.

Danny Alonso Angulo Borbor

A mis padres Melita y Marcos, por siempre haberme apoyado, por la gran motivación constante y por el amor incondicional que siempre me brindaron.

A mis abuelos Victoria e Isidoro que desde el cielo siempre guían mis pasos.

A mis tíos Marlene y Jesús, por haberme fomentado el deseo de superación, por ser ejemplos de perseverancia y constancia.

Al amor de mi vida por estar a mi lado siempre apoyándome.

Andira Victoria Dionisio Valencia

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Inca Garcilaso de la vega y a toda la plana de docente que contribuyeron con nuestra formación profesional y académica.

Al Mg. Q.F Flores López Oscar Bernuy, asesor, que nos dedicó su tiempo y su profesionalismo y nos ayudó a realizar el presente trabajo de investigación.

A la Dra. Laura Villanueva Blas, que nos apoyó a lo largo de toda la carrera.

A nuestros familiares y seres queridos quienes han sido nuestra motivación constante y fuente inspiración en este proyecto y a lo largo de toda nuestra vida.

Danny y Andira

ABREVIATURAS

II: Índice de irritación

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CG-EM: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

CONCYTEC: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica

ECVAM: Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos

HET-CAM: Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina

MP: Muestra Problema

SDS: Dodecilsulfato de Sodio

TPA: Enzima elaborada por el cuerpo que ayuda a disolver los coágulos de sangre

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

INDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Abreviaturas	
Índice General	
Índice de Tablas	
Índice de Figuras	
Índice de Anexos	
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Formulación del Problema	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	4
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación e importancia del estudio	4
1.5. Limitaciones de la investigación	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes del estudio	6
2.1.1. Nacionales	6

2.1.2. Internacionales	9
2.2. Bases teóricas	11
2.2.1. Bases legales	11
2.2.2. HET - CAM	12
2.2.3. Taxonomía del toronjil	14
2.2.4. Origen y distribución	14
2.2.5. Características botánicas de la planta	15
2.3. Hipótesis	18
2.3.1. Hipótesis general	18
2.3.2. Hipótesis específica	18
2.4. Variables	18
2.4.1. Tabla Operacionalización de variables	19
2.5. Marco conceptual	20
CAPÍTULO III: MÉTODO	22
3.1. Tipo de estudio	22
3.2. Población	22
3.3. Muestra	23
3.4. Técnica e instrumentos de recolección de la muestra	23
3.5. Procesamiento de datos	33
CAPÍTULO IV: PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS	34
4.1. Presentación de resultados	34
4.2. Contrastación de Hipótesis	38
4.3. Discusión de resultados	40

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1. Conclusiones	41
5.2. Recomendaciones	42
REFERENCIAS	43
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Materiales y Equipos para la elaboración del extracto hidroalcohólico	25
Tabla 2	Materiales y Equipos usados para la incubación	26
Tabla 3	Materiales usados para la prueba de solubilidad	26
Tabla 4	Reactivos usados para la marcha fitoquímica.	30
Tabla 5	Clasificación del índice de irritabilidad	32
Tabla 6	Prueba de solubilidad del extracto hidroalcoholico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis L.</i> (Toronjil).	34
Tabla 7	Marcha fitoquímica del extracto hidroalcoholico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis L.</i> (Toronjil)	35
Tabla 8	Resultados de los controles del método HET - CAM	36
Tabla 9	Resultados del método HET – CAM del extracto hidroalcoholico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis L</i> (Toronjil)	36
Tabla 10	Resultados del método HET – CAM con la crema base de tipo lannett	37
Tabla 11	Resultados del método HET – CAM con la crema lannett con el extracto hidroalcoholico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis L</i> (Toronjil)	37
Tabla 12	Anova de un factor para la hipótesis general	38

Tabla 13	Metabolitos secundarios para hipótesis específica 1	39
Tabla 14	Anova de un factor para la hipótesis específica 2	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Membrana corioalantoidea	12
Figura 2	Etapas del resultado del HET – CAM	13
Figura 3	Herborizado de <i>Melissa officinalis</i> L (Toronjil)	14
Figura 4	Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más usuales	16

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Matriz de consistencia	47
Anexo 2	Certificado de la especie botánica de la planta de estudio	48
Anexo 3	Recolección de la especie botánica	49
Anexo 4	Secado, molienda, filtrado y obtención del extracto	50
Anexo 5	Prueba de solubilidad	51
Anexo 6	Tamizaje Fitoquímico	52
Anexo 7	Elaboración de la crema base con extracción seca de la especie vegetal	53
Anexo 8	Aplicación del método HET – CAM	55

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el perfil de seguridad que presentarán las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) mediante el método HET-CAM, para ello se realizó un estudio aplicado transversal y experimental. La metodología usada fue la evaluación del índice de irritabilidad por el método de HET-CAM. Para la realización de la investigación fue necesario adquirir 50 huevos de gallina fértil en el distrito de Santa Clara - Ate. La especie vegetal fue recolectada en la provincia de Chanchamayo departamento de Junín, se recolectó 2 plantas enteras para realizar la taxonomía y 5 kilos de hojas para la obtención del extracto. El extracto hidroalcohólico se preparó a base de hojas secas. Se realizó la prueba de solubilidad, la marcha fitoquímica y la evaluación del HET-CAM, se preparó crema base tipo Lannett a la cual se le agregó el extracto a diferentes concentraciones. 5%, 10%, 50%, asimismo se empleó controles positivos Hidróxido de sodio 0.1N, Lauril sulfato de sodio al 1% y como control negativo se usó suero fisiológico en los huevos fértiles. Resultados: las evaluaciones de solubilidad del extracto hidroalcohólico demostraron ser muy soluble en agua y soluble en etanol, en la marcha fitoquímica se evidenciaron metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, terpenos y cumarinas. La determinación del perfil de seguridad se realizó por el método de HET-CAM encontrándose que la crema al 5% resulta ser no irritante, las otras al 10 y 50% de concentraciones resultaron ser irritante leve sobre la membrana corioalantoidea de los huevos de gallina fértiles. Se concluye que las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) son seguras y pueden administrarse bajo la respectiva evaluación en afecciones como alergias, quemaduras y heridas.

Palabras clave: Formulaciones magistrales, HET-CAM, membrana corioalantoidea.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the safety profile presented by topical master formulations made with the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* L. leaves (Toronjil) by means of the het cam method, for which a cross-sectional and experimental study was carried out. The methodology used was the evaluation of the irritability index by the het-cam method. In order to carry out the research, it was necessary to acquire 50 fertile chicken eggs in the district of Santa Clara - Ate. The vegetal species was collected in the province of Chanchamayo department of Junín, 2 whole plants were collected to perform the taxonomy and 5 kilos of leaves to obtain the extract. The hydroalcoholic extract was prepared from dry leaves. The phytochemical march and the evaluation of het-.cam were carried out on the solubility test, Lannett-type base cream was prepared, to which the extract was added at different concentrations. 5%, 10%, 50%, positive controls were also used 0.1N sodium hydroxide, 1% sodium lauryl sulfate and as a negative control physiological serum was used in the fertile eggs. Results: the solubility evaluations of the hydroalcoholic extract proved to be very soluble in water and soluble in ethanol; in the phytochemical march, secondary metabolites were found such as phenols, flavonoids, terpenes and coumarins. The determination of the safety profile was made by the HET-CAM method, finding that the cream at 5% turns out to be non-irritating, the others at 10 and 50% concentrations turned out to be mild irritant on the corioallantoic membrane of the fertile chicken eggs. It is concluded that the topical master formulations made with the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* L. leaves (Toronjil) are safe and can be administered under the respective evaluation in conditions such as allergies, burns and wounds.

Keywords: Magisterial formulations, HET-CAM, chorioallantoic membrane.

INTRODUCCIÓN

La piel es un órgano que nos comunica con el entorno, actúa como una barrera protectora que nos aísla y nos protege del medio que nos rodea (rayos UVA-UVB, agentes patógenos, químicos o mecánicos). Pero no solo eso, sino que además la piel es nuestra presentación, permite visualizar rasgos relacionados con nuestra edad y salud. El protegerla, hidratarla, cuidarla y mantenerla en óptimas condiciones es una ardua tarea que necesariamente debe realizarse y el no hacerlo traería perjuicios de tipo fisiológico. Muchas sustancias que se lanzan al mercado, mencionan que tienen la propiedad de mejorar la apariencia de la piel, revitalizar o corregir las imperfecciones, pero también muchas sustancias de dudosa procedencia que se expenden en los diferentes comercios, pueden causar daño y alteraciones como irritación dérmica, enrojecimiento (eritema) e inflamación (edema). Las grandes empresas farmacéuticas y cosméticas evalúan sus productos con pruebas tradicionales (Prueba en animales) para comprobar la inocuidad de sus productos, las oficinas farmacéuticas que elaboran sus productos magistrales no tienen contemplado en sus protocolos la evaluación de sus productos tópicos terminados y los dispensan a los pacientes los cuales muchas veces presentan problemas relacionados con el medicamento PRM y deben discontinuar su tratamiento. Hay 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, de la misma forma, la oficina farmacéutica que realiza preparaciones magistrales podría emplear este método y ofrecer seguridad y confianza sobre los productos elaborados. Para evaluar productos cosméticos, la normativa en el Perú todavía exige el uso de animales de experimentación (Conejos) (UNESCO, 1989) y a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NRC,

1996). Sin embargo, a nivel mundial es una exigencia el usar métodos alternativos para evaluar toxicidad, irritación, dermatitis.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

En la ciudad de Lima existen muchas oficinas farmacéuticas que elaboran productos magistrales en forma de gel o crema para el cuidado de la piel, en esa preparación los formuladores utilizan compuestos químicos y activos biológicos para proporcionar a su producto una propiedad farmacológica, sin embargo, a los productos terminados no se les realiza en Índice de Irritabilidad (II). El índice de irritabilidad puede ser determinado por el test Draize, el cual mide la irritabilidad usando los ojos y la piel de los animales ¹. Las nuevas alternativas de evaluación emplean procedimientos más amigables y menos dañino para los animales, este es el caso de HET-CAM. ²

A fin de determinar si los preparados magistrales poseen propiedades irritantes prepararemos formulaciones según lo descrito en formularios oficiales y los someteremos a la determinación de HET-CAM para así poder afirmar si poseen o no propiedades irritantes.

A la búsqueda de romper paradigmas en la investigación, HET-CAM (Hen's egg test chorioallantoic membrane) es una alternativa para la evaluación de la irritación ocular producida por cosméticos; por su rapidez, simplicidad, sensibilidad, fácil ejecución y su relativo bajo costo. ³

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Qué perfil de seguridad presentarán las formulaciones magistrales tópicas, elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa*

officinalis L. (Toronjil) mediante el método HET-CAM?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Cuáles serán las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil)?
2. ¿Qué índice de irritabilidad presentarán las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el perfil de seguridad que presentará las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) mediante el método HET-CAM.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Identificar las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil).
2. Evaluar el índice de irritabilidad que presentarán las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM.

1.4. Justificación e importancia del estudio.

El desarrollo de la investigación es importante porque cada vez más las oficinas farmacéuticas están ofreciendo el servicio de preparaciones magistrales y los

productos terminados no siguen una evaluación de índice de irritabilidad.

La investigación es importante porque los resultados obtenidos servirán de base para implementar estas evaluaciones en formulaciones magistrales y cosméticos en el Perú

La investigación es novedosa porque emplea una técnica poco conocida la cual consiste en usar huevos de gallina fértiles evitando así el uso y sufrimiento de animales de experimentación.

Este estudio es relevante porque en la actualidad los ensayos *In vitro* son una alternativa por su economía, simpleza y mayor rapidez en los resultados.

La presente investigación logrará dar inicio a la realización de nuevas y futuras investigaciones en el campo de la toxico farmacología para dar lugar al reemplazo de procedimientos dañinos e invasivos y utilizar cada vez menos animales en la experimentación.

1.5. Limitaciones de la investigación

La falta de investigaciones relacionadas a formulaciones magistrales evaluadas por el método de HET-CAM en Perú hace que este trabajo se convierta como uno de los pioneros en su género.

El no contar con una incubadora de huevos de gallina, por lo que se hace imperativo adquirir un equipo o fabricar artesanalmente una incubadora.

La falta de información sobre empresas donde se puedan adquirir huevos de gallinas fértiles, por lo que se hace necesario buscar galpones y corrales de gallina en los diferentes distritos de Lima.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del Estudio

2.1.1. Nacionales

Mendoza M. et al. ⁵ (2013) Realizaron una investigación para evaluar la actividad irritante (II) de los componentes químicos de "*Ulomoides dermestoides*" (Tenebrionidae). Se recolectó varios ejemplares con los cuales se prepararon extractos metanólicos y hexanólicos. Para identificar los metabolitos presentes en el extracto, se empleó 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 se usó Nimesulida. Al desarrollar la parte experimental, los resultados obtenidos fueron: presencia de ácidos como esteárico, linolenico, linoleico y oleico, además se encontraron compuestos aromáticos pertenecientes al limoneno y limoniol. Un hallazgo importante fue la presencia de alcoholes de alto peso molecular, así como quinonas, benzoquinonas y etil benzeno. Los resultados demostraron que el extracto metanólico presentó un 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. Se concluye que el extracto metanólicos de *U. dermestoides*, es no irritante y este resultado se debe a la presencia de ácido oleico y el limoneno.

Taype E. ⁶ (2015) Realizó una investigación usando el método de HET-CAM cuantitativo y cualitativo. El objetivo fue evaluar la actividad irritante 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 mollisima* HBK (tumbo serrano) ya que la industria cosmética utiliza con regularidad estas frutas alterándolas con otros activos. Los estudios se realizaron en 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. La técnica fue validada mediante parámetros de robustez, linealidad, exactitud y precisión. Se concluyó que la validación de la técnica de HET-CAM cualitativo y cuantitativo, los resultados fueron lineal, exacto y preciso, pero no robusto.

Fernández M. et al ⁶ (2014) Realizaron una evaluación para determinar la toxicidad ocular de los colirios de Voriconazol y Fluconazol, estos productos son utilizadas en la queratitis fúngica. Para la determinación de la toxicidad, se utilizó la técnica de HET-CAM Hen s Egg Test- Chorioallantoic Membrane, esta técnica emplea huevos de gallina fértiles con membrana corioalantoidea y embriones de pollo. La metodología consistió en evaluar las características de una formulación farmacéutica colirios de Fluconazol 2 mg/mL y Voriconazol 10mg/mL, elaborada por los Químicos Farmacéuticos en el servicio de farmacia Hospital Clínico Universitario de Santiago. El índice de irritabilidad dérmica por el método de HET-CAM emplea 300 segundos, tiempo necesario para la demostración de los efectos (Hemorragia. Lisis, Coagulación) IS, "Irritation Score". Los resultados demostraron que los colirios de Voriconazol y Fluconazol no demostraron IS Irritation Score.

Churampi L. et al ⁸ (2015) Realizaron una investigación para evaluar el activo biológico obtenido del extracto de frutos de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey (tumbo serrano). 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). Los metabolitos secundarios, encontrando a través de estos ensayos fueron poli fenólicos y flavonoides; responsables de la capacidad antioxidante y farmacológico. De los extractos preparados se seleccionó la concentración al 20% con los cuales se prepararon dosis de 500 y 1000µg. 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 cual se recomienda su uso en la industria cosmética.

Inocente M. et al ⁹ (2013) Realizaron una evaluación en la Facultad de Medicina de la Universidad San Martín de Porras, para determinar el efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de *Myrciaria dubia* (camu camu), mediante el método HET-CAM, al evaluar las formulaciones cosméticas en la membrana corioalantoidea de huevos de gallina, demostraron una carencia de hemorragia, lisis y coagulación. Los productos son considerados como no irritantes y seguros

Buendía J ³⁰ (2015) Determinó el efecto sedante de *Melissa officinalis L* (Toronjil) más *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) sobre ansiedad inducida en ratones albinos. La metodología consistió en preparar extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones y administrarlo a ratones y ratas de prueba, se comparó la prueba con Diazepam, se realizó la marcha fitoquímica para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos. Los resultados demostraron la presencia de compuestos fenólicos, esteroides, azúcares, quinonas, terpenos y flavonoides. Se concluye que el extracto de *Melissa officinalis L* (Toronjil) más *Matricaria chamomilla* (Manzanilla) tiene efecto sedante.

Pineda N. et al ³⁶ (2019) Realizó una investigación con la finalidad de evaluar el efecto irritante de *Hylocereus megalanthus* (cactaceae) (pitahaya) *in vitro*. Se elaboró un gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de la fruta y se evaluó la seguridad de la fórmula por el método HET-CAM, para demostrar seguridad y eficacia de la formulación. La "pitahaya" fue recolectada en la provincia de Huaral, departamento de Lima, en el sector denominado Virgen de la Esperanza, a una altitud de 190 ms.n.m. El gel fue preparado a base de carbopol, trietanolamina y agua desionizada; Para la elaboración del extracto acuoso, se utilizaron 300 g de mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (pitahaya) por litro de agua, concentrándose el solvente con ayuda del rotavapor. Las concentraciones de gel preparado con el extracto acuoso fueron del 0.5 % y 1 % y se emplearon NaOH 0.1N y LSS como control positivo. El estudio fitoquímico determinó la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, quinonas, glucósidos, terpenoides y fenoles. Las formulaciones farmacéuticas elaboradas con el gel mantuvieron intacta la membrana

corioalantoidea sin provocar efecto irritante y permitieron clasificar al producto como no irritante. Se espera utilizar la formulación en ensayos de fase I.

2.2.2. Internacionales

González Y. et al ⁴ (2011) Realizaron una investigación con la finalidad de evaluar el índice de irritabilidad del producto oftálmico a base de *Spirulina platensis* (microalga Verde-Azul), el cual es un producto destinado para ser usado en seres humanos. La metodología usada para la determinación del índice de irritabilidad (II) fue el HET-CAM, el cual es una técnica que no emplea animales de experimentación.

Para la evaluación se usaron 40 huevos fértiles con un periodo de incubación de 10 días, en ese tiempo la membrana corioalantoidea ya se ha formado y puede ser factible la administración de las sustancias de estudio. La membrana corioalantoidea es una estructura que se asemeja al ojo humano ya que presenta sistemas vasculares semejantes por lo tanto se puede replicar el ensayo Draize (pruebas en animales). Los resultados obtenidos demostraron que el producto evaluado no presenta hemorragia, lisis y coagulación, por lo tanto puede afirmarse que el producto es inocuo y se puede utilizar oftálmicamente.

Murillo J. ¹⁰ (2011) Comparó la técnica de HET-CAM con el ensayo en animales, con la finalidad de evaluar la actividad irritante ocular y demostrar que ambas técnicas ofrecen los mismos resultados. El procedimiento fue realizado en cuba y empleó: membrana corioalantoidea formado en los huevos fértiles de 10 días de incubación y 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 resulto 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.

Rodríguez A. et al ¹¹ (2011) Realizaron una investigación para determinar la “actividad anti-irritante del extracto etanólico de la raíz de *Cnidocolus urens L.*”, 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 Se determinó la actividad anticoagulante. Se concluye que a una concentración de 10mg/mL el extracto etanólico de raíz de *Cnidocolus urens L* posee actividad anti irritante, anti-hemorrágica y anticoagulante pero no posee actividad anti-vasodilatadora.

Batista A. ¹² (2013) Realizó una investigación para evaluar la actividad inmunotoxicológica de adyuvantes vacúnales 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 vacúnales y proteínas humanas es de gran valor, pero su alcance para la predicción de autoinmunidad a nivel preclínico es limitado.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Bases legales

- Normas Nacionales
- Ley N°30407
- Ley de protección y bienestar animal
- **Artículo 19.** Centros que utilizan animales en actos de experimentación, investigación y docencia.

El presente artículo hace mención que solo en los establecimientos y centros superiores, tanto públicos como privados se pueden utilizar animales de experimentación, siempre y cuando la institución cuente con el comité de ética de tal manera que los datos sean veraces y se pueda asegurar la protección de animales.

Se debe manejar las normas de bioseguridad y regularizar las prácticas de manejo de animales en la experimentación, reducir los niveles de dolor físico y todo acto que perjudique a los sujetos de experimentación.

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

Para trabajar con animales de experimentación, se debe formar un Comité de ética, este comité estará formada por miembros sugeridos por el CONCYTEC.¹³

En el Perú existe el comité nacional de ética que 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 basados en 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. HET-CAM

Es un ensayo que tiene por objeto evaluar la capacidad de las sustancias de producir irritabilidad (II). Esta prueba simula la prueba Draize la cual consiste en determinar el índice de irritabilidad de una sustancia usando la piel o el ojo de los animales. El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, Ispra, Italia), validó la técnica HET-CAM y 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. ¹⁷

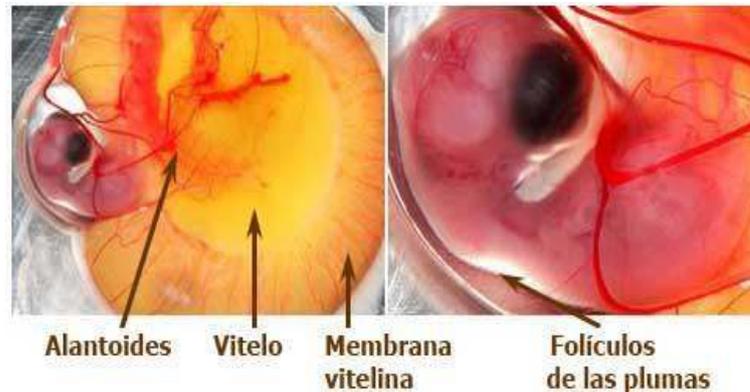


Figura 1: Membrana corioalantoidea

Fuente: aviculturainfo.es 2019

La prueba exige aplicar concentraciones definidas y evaluar la acción de las mismas sobre la membrana formada en los huevos de gallina.

Al incubar los huevos de gallina por 10 días, 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.

El método tradicional usa conejos para medir la irritabilidad, la sustancia es administrada directamente en el ojo del animal, algunos modelos permiten la permanencia de las sustancias de estudio por 15 horas, esta larga exposición puede causar en el animal de experimentación irritación, úlceras, hemorragia, visión borrosa. HET-CAM reemplaza el empleo de animales de experimentación.¹⁸

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

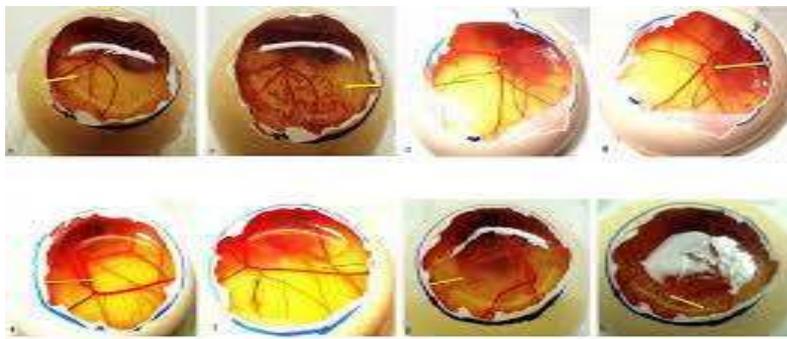


Figura 2: Etapas del resultado del HET-CAM

Fuente: Scielocid.co

2.2.3. Taxonomía del Toronjil

***Melissa officinalis* L. (Toronjil)**

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyt

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Lamiaceae

Orden: Lamiales

Familia: Labiadas

Género: *Melissa*

Especie: *officinalis*

Nombre: *Melissa officinalis* L.

2.2.4. Origen y distribución

Es una planta muy distribuida en el Perú, por sus propiedades medicinales, se trata de una planta que presenta fuerte olor y aroma el cual se asemeja a limón y preparado artesanalmente se puede utilizar en mate o como infusión para procesos de ansiedad y tranquilizar los estados emocionales. En cuanto a sus hojas que son la parte más aprovechada de la planta se asemeja a la ortiga. Esta planta se cultiva principalmente en los países europeos y asiáticos, en nuestro país se ha aclimatado y ha logrado reproducirse con las mismas potencialidades.²⁰



Figura 3: Herborizado de *Melissa officinalis* L. (Toronjil)

Fuente: Wisflora herbarium medicines

2.2.5 Características botánicas Planta

Es una herbácea, que desprende mucho aroma, en estado silvestre llega a medir 90 cm. de altura.

Tallos

Presenta tallos rectos, con muchas vellosidades que recorre todo su surco.

Hojas

De un color verde intenso, de tipo peciolada y grande, presenta borde rizado y aserrado. Las hojas presentan compuestos químicos como alcoholes, aldehídos, asimismo, presentan diferentes tipos de aceites esenciales en los que se destacan: geraniol, citral a y b.

Flores

Presenta colores característicos dependiendo la zona, es así que pueden vestirse de flor rosada, blanco amarillento o blanquecina, su aroma recuerda alimón. ²¹

Hábitat

Es una planta silvestre crece en jardines prados y a lo largo del camino, es una planta que resiste diferentes climas, aunque se desarrolla mejor en sitios frescos y sombreados. Puede cultivarse con facilidad. La parte útil de la planta se colecta durante la floración, para utilizar el material, es necesario secarlo a la sombra y almacenarlo en frascos ámbar y bien limpios.

Composición Química

Las hojas contienen aceites, diferentes aldehídos y alcoholes, también presentan flavonoides, taninos, ácidos triterpénicos y saponinas. ²¹

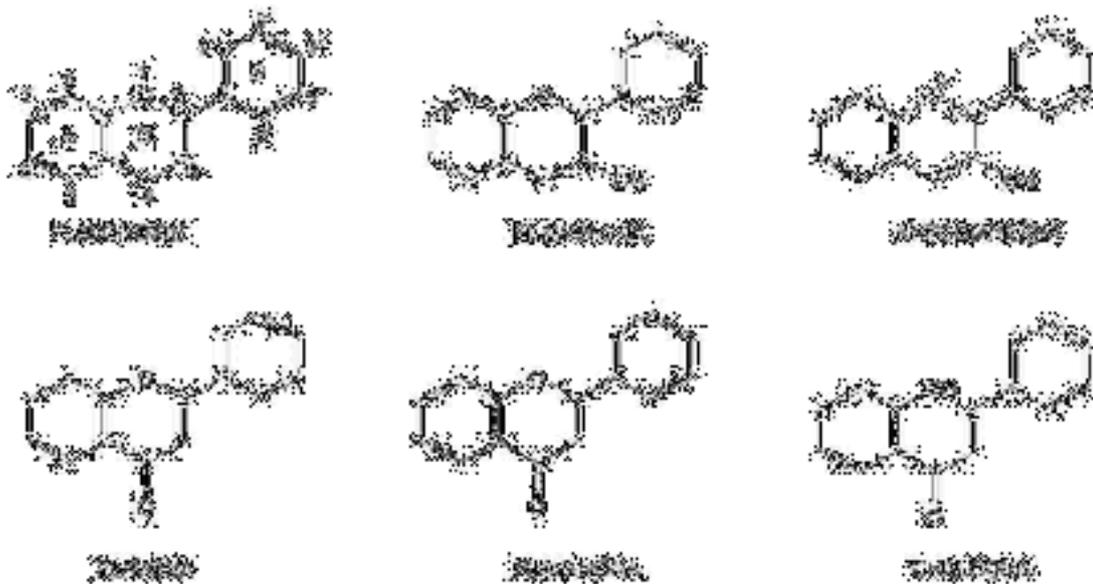


Figura 4: Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más usuales.

Fuente: plantas medicinalesfarmacognosia.com 2015

Cultivo

No es una planta muy exigente, puede adaptarse a cualquier clima y tipo de suelo. Desde su introducción en el Perú, esta planta se adaptó en el suelo arcilloso de nuestra geografía. Sin embargo, en las zonas donde hay sombra, la planta crece con mayor vigor y mayores propiedades farmacológicas. ⁽²²⁾

Multiplicación: Se realiza con los brotes de la planta, se selecciona el material a trasplantar y se siembra teniendo una separación de 60 centímetros. La mejor época para la propagación de la *Melissa officinalis* L. es durante la primavera o el otoño.

Por semillas: Es especial, requiere calor para poder germinar, es por ello que los agricultores siembran estas plantas en época de verano para aprovechar el calor y favorecer la germinación de la semilla. Se pueden sembrar también a partir de esquejes, pero para ello es necesario distanciar los esquejes a una distancia de 20 cm para evitar la aglomeración de plantas y puedan disminuir su crecimiento.

Recolección

La planta está disponible todo el año, se seleccionan las hojas aquellas que presenten mejores características organolépticas, se recolecta antes de la floración, donde el nivel de metabolitos es más alto, si se da la floración, se debe esperar 20 días para proceder a recolectar la parte útil de la planta.

Producción

Se cultiva en la sierra, generalmente son las plantas silvestres las que se utilizan en actividades económicas por sus capacidades farmacológicas.

El continente europeo es uno de los continentes que más cultivan plantas medicinales pese a lo avanzado de su tecnología. Los países europeos entre los que destacan Francia e Italia, utilizan las plantas aromáticas para obtener esencias de alta calidad y valor, estas esencias luego son comercializadas a nivel mundial.²³

Usos Medicinales

a) Uso interno: la administración de esta planta puede utilizarse para el tratamiento de los trastornos nerviosos, estomacales y respiratorios.

b) Uso externo: en afecciones cutáneas de la piel como por ejemplo Herpes, para ello se puede preparar una cocción con las hojas secas y aplicar directamente sobre las lesiones dérmicas.

Efectos

La preparación y toma de infusiones puede provocar un efecto antiespasmódico, carminativo, antiviral, por ello es muy solicitada por aquellas personas que padecen estos tipos de enfermedades. Los trastornos digestivos pueden tratarse tomando una infusión (2 tasas al día) ya que ayuda a eliminar los espasmos y mejora la digestión, provocando la producción de enzimas

digestivas. Se utiliza también en forma de esencia como perfume para aromatizar los ambientes y para ayudar al mantenimiento de la ropa que se guarda por cambio de estación. En áreas con mucha humedad, esta planta evita la formación de hongos.²⁴

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

Las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y evaluadas por el método de HET-CAM son seguras.

2.3.2 Hipótesis específicas

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) presentan varias clases de metabolitos secundarios.
2. Las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM, presentan bajo índice de irritabilidad.

2.4. Variables

Variable independiente

Extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil).

Variable dependiente

Perfil de seguridad por el método del HET-CAM

2.4.1. Tabla de operacionalización de Variables

VARIABLES	DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADOR	ESCALA
VI Extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melisa Officinalis L.</i> (Toronjil)	a.-Identificación Macroscópica b. Identificación Física c.- Identificación de Metabolitos secundarios	a.- Taxonomía b.- Solubilidad c.-Metabolitos Flavonoides Fenoles Taninos Saponinas Leucoantocianinas Lactonicos Triterpenos Quinonas Alcaloides	a.- Ficha Taxonómica b.- Ficha de datos de solventes de diferentes polaridades c.- Ficha de recopilación de datos para Metabolitos secundarios Rx de shinoda Rx de fecl3 Rx de proteínas Met. de espuma Rx rosenheim Rx de legal Rx de liebermann - Burchard Rx de borntranger Rx de dragendorff - mayer	Hoja Solubilidad Coloración Rojiza Azul, verde, negro Blanco Espuma Rojo Rojo oscuro Verde, azul Rojo en fase acuosa Anaranjado-blanco, crema	SI / NO Muy soluble Soluble Poco soluble Insoluble +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/- +/-
VD Perfil de seguridad por el método del HET-CAM	Identificación macroscópica de la membrana coriolantoidea	Lisis, Hemorragia, Coagulación	Ficha de irritación	Lesión o daño a la membrana corioalantoid ea	No irritante Irritante Leve Irritante Moderado Irritante Severo

2.5. Marco conceptual

PRUEBA DE DRAIZE

Procedimiento utilizado por la industria cosmética para evaluar la irritabilidad de las sustancias o productos terminados, es una prueba que emplea animales de experimentación y se administra las sustancias de estudio en la piel o en el ojo del animal. ²⁶

IRRITACIÓN AGUDA

Es un proceso reactivo de tipo doloroso o inflamatorio que sufre el organismo, ocasionado por la presencia de un agente físico, químico, microbiológico o estímulos (pe: el calor o la luz ultravioleta), que se manifiesta como alergia. La irritación puede darse en diferentes partes del cuerpo: los ojos, la nariz, los intestinos (colon irritable), la piel. ²³

MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

Es una estructura que se forma en el huevo producto del proceso embrionario 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

EMBRIÓN

En un organismo que se encuentra en etapa de desarrollo, es producto de la fusión del de esperma y del huevo en un proceso llamado fertilización, el embrión es un organismo que se desarrolla y que en su información genética lleva el ADN de los progenitores. 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

IN VITRO

Es un procedimiento experimental controlado que se realiza en un laboratorio y que permite evidenciar un acontecimiento bajo parámetros diseñados por el investigador.²⁴

PERFIL DE SEGURIDAD

Característica de un medicamento que le permite emplearse con una probabilidad muy pequeña de causar efectos tóxicos no justificables, mediante una apropiada relación riesgo/beneficio, lo que se encuentra condicionado por el medicamento en sí mismo y las condiciones de su prescripción y uso.²⁶

FORMULA MAGISTRAL

Es el medicamento destinado a un paciente individualizado, preparado por el farmacéutico, o bajo su dirección, dirección, para cumplimentar expresamente una prescripción facultativa detallada de los principios activos que incluye, incluye, según las normas de correcta elaboración y control de calidad establecidas al efecto, efecto, dispensado en oficina de farmacia o servicio farmacéutico y con la debida información al usuario.²⁷

CAPÍTULO III: MÉTODO

3.1. Tipo de estudio

3.1.1 Según el nivel de conocimiento científico la investigación fue:

a.- Básica: Por que tuvo como finalidad la obtención y recopilación de información afín de ir construyendo una base de conocimiento que suman a la información previa existente.

b.- Transversal: Debido a que el estudio se realizó en un determinado tiempo.

c.- Experimental: Ya que se trabajó con huevos de gallina fértiles y especies botánicas con actividad terapéutica en forma aleatoria.

3.2. Población

3.2.1. Población vegetal:

La especie vegetal fue recolectada en la provincia de Chanchamayo departamento de Junín, se recolectó 2 plantas enteras para realizar la taxonomía y 5 kilos aproximadamente, la densidad de la planta se estimó en 10 arbustos por m².

3.3.2. Población Biológica:

Para la realización de la investigación fue necesario adquirir 50 huevos de gallina fértil de la "Granja Ronald", ubicado en el distrito de Santa Clara- Ate.

3.3. Muestra

3.3.1. Muestra vegetal:

Para la actividad irritante por el método de HET-CAM se utilizó 20 huevos fértiles de gallinas White Leghorn de tamaño mediano de 50-60g de peso aproximadamente, de color y aspecto uniforme.

3.3.2. Muestra Biológica:

Para el extracto hidroalcohólico se seleccionó 300g de hojas por sus características organolépticas con las cuales se preparará el extracto hidroalcohólico.

3.4. Técnica e instrumento de recolección de la muestra.

3.4.1. Recolección de huevos de gallina.

Para recolectar los huevos de gallina fue necesario trasladarse al distrito de Santa Clara – Ate donde se encuentra la granja. Se solicitaron los huevos y se seleccionaron aquellos que tengan un tamaño regular y un color uniforme, además los que no presentaron ninguna rajadura y laceración ya que podría perjudicar el proceso de incubación. Los huevos fueron protegidos individualmente con papel toalla y franela, transportados en contenedores acondicionados para evitar el daño y la ruptura.

3.4.2. Colección de la planta.

Se realizó en la provincia de Chanchamayo departamento de Junín, para

recolectar la planta fue necesario viajar al lugar donde en estado silvestre se desarrolla. Para la ubicación de la planta fue necesario contratar a un guía de la zona que conocía los lugares donde crece la planta. Se recolectaron plantas jóvenes de 6 meses de edad y de 50 cm de altura aproximadamente, se escogieron aquellas hojas que presentan la mejor apariencia organoléptica. También fue necesario recolectar una planta entera para poder realizar la taxonomía en Lima. Las hojas y la planta fueron acondicionadas en bolsas plásticas y cajas de cartón para su traslado a la ciudad de Lima.

3.4.3 Eliminación de desechos biológicos.

Los desechos biológicos incluyen todos los órganos, tejidos y partes del cuerpo humano o animal que son desechados debido a que cualquiera de estos puede contener agentes infecciosos. Para su eliminación, se debe empaquetarlos usando una doble capa de bolsas especiales para evitar fugas. Luego de colocarlos en un contenedor secundario, se eliminan mediante la incineración u otro tratamiento químico. Vale mencionar que el autoclavado no es apropiado para este tipo de residuo.

3.4.3. Clasificación taxonómica

Se determinó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM por la Dra. Joaquina Adán Castillo

3.4.4. Preparación de la maceración

Una vez obtenida las hojas, estas fueron seleccionadas de acuerdo a sus características organolépticas, se escogieron hojas de buen tamaño y se desechó aquellas que hubieran sido dañadas por insecto o plagas.

Luego de seleccionar las hojas, las que pasaron el primer control, fueron lavadas con abundante agua de grifo, teniendo en cuenta de regular la salida de agua para que la presión no las llegue a estropear.

Luego las hojas fueron secadas con papel toalla de manera individual y

colocadas en papel Kraff. Luego fueron secadas en una estufa con aire circulante a una temperatura de 40°C hasta peso continuo. Cuando las hojas estuvieron bien secas, se procedió a triturar con ayuda de un pequeño molino manual.

Las hojas trituradas fueron tamizadas para uniformizar el tamaño de partícula. Se pesaron 300 gramos de hojas secas trituradas y se colocaron en un frasco de vidrio de boca ancha, a esto se le adicionó 1 litro de alcohol de 70° y se tapó herméticamente el frasco.

El producto contenido en el frasco fue homogenizado y agitado dos veces al día mañana y noche para extraer los metabolitos presentes en las hojas, durante 8 días.

Posteriormente, se filtró el extracto hidroalcohólico y se colocó en un recipiente adecuado para evaporar el solvente con ayuda de una estufa a 40°C por 7 días aproximadamente.

Una vez evaporado, el extracto seco, fue recogido con una espátula fina y se colocó en un pequeño envase de vidrio ámbar para su posterior uso. Previamente se pesó la cantidad o rendimiento obtenido en la extracción.

Tabla 1 Materiales y Equipos para la elaboración del extracto hidroalcohólico.

Materiales	Equipos
Beacker	Estufa
Embudo	Balanza
Fuente de vidrio	Refrigeradora
Frasco de boca ancha	Equipo de filtración
Soporte universal	
Aro de soporte	
Probeta	
Bagueta	

3.4.5. Incubación de los huevos

Para este procedimiento se adquirió una incubadora de huevos, se programó el equipo para controlar los parámetros establecidos. La temperatura que no debió pasar los $37,5 \pm 0,5$ °C y la humedad que debió estar alrededor de $62,5 \pm 7,5\%$, Los huevos tuvieron que ser movidos diariamente a fin de lograr una incubación homogénea. El tiempo estimado de la incubación fue de 9 días, la revisión del proceso de incubación fue determinada por un ovoscopio el cual verificó la formación de la membrana corioalantoidea.

Tabla 2 Materiales y Equipos usados para la incubación.

Materiales	Equipos
Molde de huevo	Incubadora
Papel kraft	Termohigrometro
Ovoscopio	
Linterna	
Beacker	
Pinza	
Tijera	

3.4.6. Prueba de solubilidad

Se realizó con la finalidad de determinar en qué solvente (polar o apolar) es soluble el extracto obtenido. ⁽³⁰⁾

Para la prueba de solubilidad se preparó la siguiente batería de tubos de ensayo:

Tubo N°1 se adicionó 0.5mL de extracto + 2mL de Etanol Tubo N°2 se adicionó 0.5mL de extracto + 2mL de Metanol Tubo N°3 se adicionó 0.5mL de extracto + 2mL de Éter

Tubo N°4 se adicionó 0.5mL de extracto + 2mL de Cloroformo Tubo N°5 se adicionó 0.5mL de extracto + 2mL de Acetona Tubo N°6 se adicionó 0.5mL de extracto + 2mL de Agua

Tabla 3 Materiales usados para la prueba de solubilidad

Materiales	Especificación	Cantidad
Tubo de ensayo	13 X100 mL	6
Gradilla	Para 48 tubos	1
Pipetas	5 mL	6
Goteros	3.5 mL	6
Pinzas	De Metal	1

3.4.7. Tamizaje Fitoquímico

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

Se desarrolló los siguientes ensayos:

a) Caracterización de taninos

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar y agregarle 3 gotas del reactivo de gelatina-cloruro de sodio. Centrifugar: Un precipitado de color blanco en el fondo del tubo de ensayo confirma la presencia de taninos.

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle 2 gotas de FeCl_3 , los resultados demostraran: Acido pirogálico, si presenta coloración azulada, catequinas, si presenta color verde. ²⁷

b) Caracterización de flavonoides

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Shinoda. Una coloración naranja indica resultado positivo, para elaborar el

reactivo, se necesita limadura de magnesio y ácido clorhídrico concentrado.²⁷

c) Caracterización de cumarinas

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de NaOH 10 %. Una coloración amarillenta sometida a la luz Uv 365nm indica resultado positivo.²⁷

d) Caracterización de quinonas

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de quinonas (etanol y NaOH al 5%) Una coloración amarilla es positiva.²⁷

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Bornträger. Una coloración rosada a roja demostrara la presencia de antraquinonas.⁽²⁷⁾

e) Caracterización de alcaloides

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Dragendorff. La presencia de un precipitado naranja a rojo demostrará una reacción positiva.²⁸

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Mayer La presencia de un precipitado blanco o crema demostrara una reacción positiva.²⁸

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Bertrand. La presencia de un precipitado blanco demostrara una reacción positiva.²⁸

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de

Sonnenschein. La presencia de un precipitado amarillo verdoso demostrara una reacción positiva. ²⁸

f) Caracterización de Carbohidratos

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Molish. La presencia de un anillo violáceo demostrara una reacción positiva.²⁸

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Antrona. La presencia de una coloración verde demostrara una reacción positiva. ⁽²⁸⁾

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle el reactivo de Fehling A y B. calentar en Baño María. La presencia de un precipitado rojo ladrillo demostrara una reacción positiva. ⁽²⁸⁾

g) Caracterización de Aminoácidos libres y grupos amino

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle 3 gotas del reactivo de Ninhidrina. La presencia de una coloración violeta demostrara una reacción positiva. ²⁸

h) Caracterización de esteroides

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle 3 gotas del reactivo de Lieberman-Burchard. La presencia de un color verde azulado indicará la presencia de Esteroides mientras que la presencia de una coloración rojo naranja indicará la presencia de Triterpenoides.²⁸

i) Caracterización de Saponinas

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, agregarle agua destilada. Agitar enérgicamente por 1 minuto. La presencia de espuma indicará reacción positiva.²⁸

j) Caracterización de Glicósidos

Tomar una pequeña cantidad de muestra a analizar, y se agregó el reactivo de Baljet. La presencia de una coloración anaranjada, indicara reacción positiva.²⁸

Tabla 4 Reactivos usados para la marcha fitoquímica

Reactivos
Solventes (Etanol 96%)
Cloruro Férrico
Reactivo de Shinoda
Reactivo de Fheling A y B
Reactivo de Mayer
Reacción de Bornträger
Reacción de Dragendorff
Reactivo de molish
Reactivo de Ninhidrina

3.4.8. Elaboración de la crema base

Para la elaboración de la crema base se necesita contar con dos sistemas de preparación independiente:

Fase oleosa: Está constituida por los insumos utilizados para la elaboración de la crema, para 100 g de crema se utilizará 10 g de cera lanet y 10 g de alcohol cetílico.

Fase acuosa: para 100 g de crema se utilizará 10 ml de propilenglicol y 7 mL

de agua destilada.

Procedimiento:

Fundir la fase oleosa hasta que esté de un color transparente, calentar la fase acuosa hasta 70°, retirar del fuego y mezclar la fase acuosa en la fase oleosa, agregar 0.5 g de lauril sulfato de sodio y agitar enérgicamente. Por agitación y enfriamiento se formará la crema.

3.4.9. 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 al 1% como controles positivos.

Para romper la cascara 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 cronómetro. Se emplearon también beacker, pipetas Pasteur y bandejas para desechar los resultados.

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 cama de aire donde se procedió a romperlos con ayuda de la tijera y extraer la cáscara con la pinza. Al retirar la cascara se observó la presencia de una membrana blanca la cual fue hidratada con cloruro de sodio y posteriormente retirada con la pinza. Los huevos ya abiertos fueron regresados a la incubadora para evitar su enfriamiento.

Se procedió a adicionar las soluciones estándar de irritación (sustancias de referencia); se observó las reacciones de hemorragia, lisis (desintegración de los vasos) y coagulación (desnaturalización de las proteínas intra y

extravasculares) por un tiempo de 5 min y se registró el tiempo en segundos en que aparecerá cada una para calcular el índice de irritación (II) 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. 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 ³⁰.

Para evaluar el perfil de seguridad, de la fórmula magistral, se elaborarán cremas con 10%, 20%, 50% de concentración con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) se colocaron cada uno por triplicado (tres huevos) sobre la MCA directamente, cubriendo no menos de la mitad de su superficie durante 5 min; después de este tiempo se lavó cuidadosamente con NaCl al 0,9% para eliminar la misma de la superficie de la membrana.

Clasificación

Se evaluará 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:

Tabla 5 Clasificación del índice de irritabilidad

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

Si se observa alguna reacción de escala 3 en cuales quiera 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.

3.5. Procesamiento de datos

Los datos fueron recolectados en fichas elaborado por los investigadores. Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se tomó el tiempo y compararán 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: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Presentación de Resultados

Tabla 6: Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis* L (Toronjil)

SOLVENTES	Extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L (Toronjil)
Agua	+++
Acetona	-
Metanol	++
Etanol	++
Cloroformo	-
Éter	-
Acetona	-

Fuente: elaboración propia, 2019

Leyenda: muy soluble (+++), soluble (++), poco soluble (+), insoluble (-)

El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis* L (Toronjil) evidencio ser muy soluble en agua, soluble en metanol y soluble en etanol.

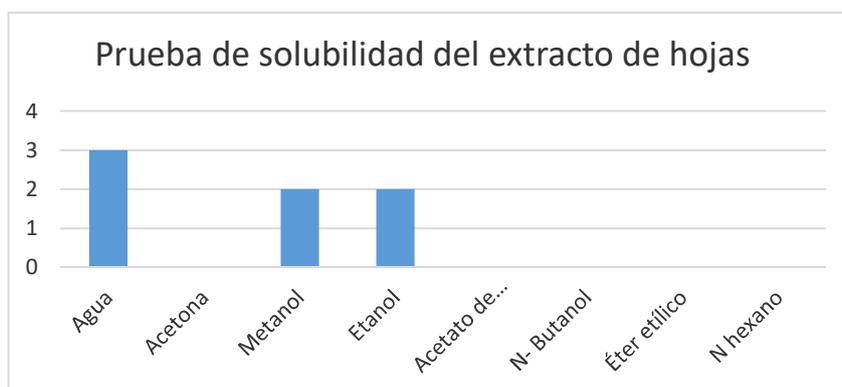


Figura 5: Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis* L (Toronjil).

Tabla 7: Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis* L (Toronjil)

METABOLITO	REACCIÓN	REACCIÓN POSITIVA	RESULTADO
CARACTERIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS	Emplear el reactivo de Molish	Anillo violeta	-
	Emplear el reactivo de Antrona	Coloración verde	-
	Emplear el reactivo de Fehling	Coloración rojo ladrillo	-
CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	Emplear el reactivo de FeCl ₃	Coloración verde o azul	++
CARACTERIZACIÓN DE TANINOS	Emplear el reactivo de Gelatina	Precipitado denso blanco	-
CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES	Emplear el reactivo de Shinoda		+++
CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS Y FLAVONOIDES CATÉQUICOS	Emplear el reactivo de Rosenheim	Coloración rojo oscuro	-
CARACTERIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES Y GRUPOS AMINO	Emplear el reactivo de Ninhidrina(0,1% en etano)	Coloración violácea	-
CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES	Emplear el reactivo de Dragendorf	Precipitado naranja	-
	Emplear el reactivo de Mayer	Precipitado blanco	-
	Emplear el reactivo de Bertrand	Precipitado blanco	-
	Emplear el reactivo de Sommerschein	Precipitado amarillo-verdoso	-
CARACTERIZACIÓN DE NAFTAQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y ANTRANONAS	Emplear el reactivo de Borntrager	Coloración roja	-
CARACTERIZACIÓN DE TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Emplear el reactivo de Liebermann-Burchard	Esteroides: verde-azul Triterpenoides: rojo-naranja	+
CARACTERIZACIÓN DE SAPONINAS	Emplear el reactivo de Generación de espuma	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min.	-
CARACTERIZACIÓN DE GLICÓSIDOS	Emplear el reactivo de Bajet	Coloración anaranjada	-
CARACTERIZACIÓN DE CUMARINAS	Emplear el reactivo de NH ₂ OH cc. 4 NaOH 10%	Fluorescencia celeste	+

Fuente: elaboración propia, 2019

Legenda: muy abundante (+++), abundante (++) , poco abundante (+), nulo (-)

Se observa que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) si presenta metabolitos secundarios. Estos son: flavonoides, taninos, triterpenoides y cumarinas.

Tabla 8: Resultados de los controles del método HET- CAM

CONTROL	TIPO DE CONTROL	REACCIÓN (SEGUNDOS)			INDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACIÓN		
SUERO FISIOLÓGICO	BLANCO	301	301	301	0	NO IRRITANTE
LAURIL SULFATO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 1	301	120	150	8.90	IRRITANTE MODERADO
HIDROXIDO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 2	160	100	140	11.55	IRRITANTE SEVERO
ETANOL	SOLVENTE USADO	198	250	280	3.60	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°8 luego de realizar los controles, se obtuvo por resultado lo siguiente: Lauril sulfato de sodio (Irritante moderado), hidróxido de sodio (irritante severo) y etanol (irritante leve), cloruro de sodio no irritante.

Tabla 9: Resultados del método HET – CAM del Extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil)

Extracto Hidroalcohólico	Concentración	REACCIÓN (SEGUNDOS)			INDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
		TIEMPO HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACIÓN		
hoja	100%	208	289	291	2,12	IRRITANTE LEVE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACIÓN 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°9 se evidencia, que el extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa*

officinalis L. (toronjil) evaluado por el método del HET-CAM expresa un índice de irritabilidad leve por lo tanto es posible elaborar un producto magistral.

Tabla 10: Resultados del método HET – CAM crema base tipo Lannett

Forma Farmacéutica	Concentración	TIEMPO	REACCION	(SEGUNDOS)	INDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
Crema base	100%	301	301	301	0	NO IRRITANTE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACIÓN 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°10 se demostró por el método de HET-CAM, que la crema base tipo Lannett es no irritante por lo tanto puede usarse como vehículo para la preparación de fórmula magistral con el extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis L.* (toronjil)

Tabla 11: Resultados del método HET – CAM crema Lannett con el extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis L.* (toronjil)

Formas Farmacéuticas	Concentración del extracto	TIEMPO	REACCIÓN	(SEGUNDOS)	INDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACIÓN		
Crema Lannett	50 %	150	280	295	3.00	IRRITANTE LEVE
Crema Lannett	10 %	190	290	295	2.30	IRRITANTE LEVE
Crema Lannet	5 %	280	289	290	0.96	NO IRRITANTE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACIÓN 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° 11 los resultados del método HET-CAM de la crema Lannett elaborado con el extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Melissa officinalis L.* (toronjil) demostró que al 5% de concentración el producto presenta un índice de irritabilidad de no irritante

4.2. Contrastación de Hipótesis general

H0= Las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L* (Toronjil) y evaluadas por el método de HET-CAM no son seguras.

H1= Las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L* (Toronjil) y evaluadas por el método de HET-CAM si son seguras

Tabla 12: Anova de un factor para hipótesis general

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	P-valor
Factor	40,555	5	7,987	1876,567	,000
Error	,555	55	,005		
Total	41,000	60			

Resultado: Como el p-valor es menor que 0.05 se puede afirmar que el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L* (Toronjil) si son seguras.

Decisión: Por lo tanto, se descarta la hipótesis nula (H0) y se acepta la hipótesis alterna (H1)

Hipótesis específicas 1

H0= El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L*(Toronjil) no presenta varias clases de metabolitos secundarios

H1= El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L* (Toronjil) si presenta varias clases metabolitos secundarios

Tabla 13: Metabolitos secundarios para hipótesis especifica 1

METABOLITO	RESULTADO
Fenoles	++
Flavonoides	+++
Triterpenoides	+
Cumarinas	+

Resultados: en la evaluación fitoquímica se observa la presencia de metabolitos secundarios con diferentes grupos químicos.

Decisión: Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Hipótesis especificas 2

H0= Las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L* (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM, no presentan bajo índice de irritabilidad.

H1= Las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis L* (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM, si presentan bajo índice de irritabilidad.

Tabla 14 Anova de un factor para hipótesis especifica 2

ANOVA de un factor					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	P-valor
Inter grupo	0.00430	5	0.0002127	1.212	,002
Inter grupo	0.32268	2	0.03666230	209.78	,002
	0.32698	10			

Resultados: como el valor de p es menor a 0.05 se puede afirmar que las concentraciones si presentan bajo índice de irritabilidad.

Decisión: Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

4.3. Discusión de resultados

Luego de determinar las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L (Toronjil) a través de la marcha fitoquímica, los compuestos encontrados fueron fenoles, flavonoides, triterpenoides y cumarinas, estos estudios son similares a los hallados por Buendia Ochoa Jesus (2015) ³⁵ quien estudio la actividad sedante de *Melissa officinalis* L “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre ansiedad inducida en ratones albinos e identifico la presencia de compuestos fenólicos, esteroides, azucares, quinonas, terpenos y flavonoides.

Al evaluar las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melisa officinalis* L. (Toronjil) por método HET-CAM, se demostró bajo índice de irritabilidad, por lo tanto, es seguro su aplicación en caso de alergias y cicatrizante tópico. Estos resultados son muy similares a los hallados por Inocente M. al (2013) ⁽⁹⁾ , quien evaluó el gel de una formulación cosmética con *Myrciaria dubia* (camu camu) por el método de HET-CAM y el resultados fue también no irritante, asimismo los resultados son comparados con Pineda N. et al (2019) quienes evaluaron el efecto irritante in vitro del gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (cactaceae) “pitahaya” por el método HET-CAM, para demostrar seguridad y eficacia de la formulación. Identificaron la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, quinonas, glucósidos, terpenoides y fenoles y además, formulaciones farmacéuticas elaboradas con el gel mantuvieron intacta la membrana corioalantoidea sin provocar efecto irritante y permitieron clasificar al producto como no irritante. Los investigadores esperan utilizar la formulación en ensayos de fase I.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil), se pudo identificar la presencia de compuesto fenólicos, flavonoides, triterpenos y cumarinas

El índice de irritabilidad por el método de HET-CAM de formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil), se determinó que el preparado al 5% no es irritante, asimismo el extracto al 50% y 10% presentaron un índice de irritabilidad leve. El perfil de seguridad que presentan las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) mediante el método HET-CAM, se puede afirmar que estos productos son seguros para ser administrados por lo tanto pueden seguir estudios de fase I en seres humanos.

5.2 Recomendaciones

1) La determinación del índice de irritabilidad por el método de HET-CAM, es una técnica alternativa a la prueba Draize que debe seguir empleándose para evaluar aquellos productos donde el potencial irritante pueda poner en riesgo la salud de las personas.

2) Este método propicia la oportunidad de disminuir el número de ensayos con animales por práctica de laboratorio, por lo tanto se recomienda su introducción de manera gradual en los ensayos de índice de irritabilidad, además de ser rápidos los análisis son económicos y seguros.

3) Es común encontrar algunos científicos que no ven con agrado la aplicación de técnicas alternas por lo tanto se recomienda realizar estudios de validación de la técnica para evitar posibles controversias al método.

REFERENCIAS

1. Bruner LH, Shadduck 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. 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 Médicas (2011).
5. 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.
6. 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.
7. Fernández, Miguel. "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.
8. 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.

9. 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).

10. 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.

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 atlantico. Colombia 2011.

12. Batista A. “Métodos alternativos para la evaluación inmunotoxicológica de adyuvantes vacúnales”. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias médicas. Universidad de ciencias médicas Santiago de Cuba. 2012

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. 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 in.glés) 39 (5): 484-486
21. 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.
22. 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.
23. Wolfert, P. *Couscous and Other Good Food from Morocco*, Harper & Row, 1973.
24. Pappa E, Guardado A. *Métodos alternativos*, *Revista Toxicol*. 1999; 16: 145.
25. Lock de ugaz O. *Investigacion Fitoquimica:Metodos en el estudio de Productos Naturales*.Fondo Editorial de la Universidad Catolica del Peru.Lima.1994.
26. 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.

27. Animals in Product Testing, National Anti-Vivisection Society, consultado el 29 de junio de 2009
28. Method Domínguez, 1973) Métodos de investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, México, pág. 229-237
29. Lüpke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem Toxic* 1985; 23: 287-291.
30. Buendía Ochoa Jesús. Efecto sedante del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* L "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" sobre la ansiedad inducida en ratones albinos. Tesis para optar el grado de Maestro en Farmacología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2015.
31. Pineda Pérez N. et al. Efecto irritante in vitro del gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" por el método HET-CAM.

ANEXOS

Anexo 1: matriz de consistencia

PERFIL DE SEGURIDAD DE LAS FORMULACIONES MAGISTRALES TÓPICAS ELABORADAS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS SECAS DE <i>Melissa officinalis</i> L. (TORONJIL) MEDIANTE EL MÉTODO HET-CAM.								
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Qué perfil de seguridad presentarán las formulaciones tópicas, elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) mediante el método HET-CAM?	Evaluar el perfil de seguridad que presentará las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) mediante el método HET-CAM.	Las formulaciones magistrales tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) y evaluadas por el método de HET-CAM son seguras	Extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil).	Identificación Macroscópica	Hoja	Ficha taxonómica	Hojas alternas Pecíolo largo Áspera Base redonda Borde ondulado (SI - NO)	LIBERIO Experimental in vivo Tipo: Básica Nivel: Correlacional Explicativa Población y muestra: 20 ensayos en huevos de gallina fértil Instrumentos de recolección de datos: Ficha de recolección de datos Instrumento s Reactivos Estufas Rota vapor Ovoscopio incubadora Técnica: HET CAM Procesamiento y análisis de datos: SPSS y ANCOVA simple (una vía) y una prueba "t" de Student para comparaciones entre tratamiento y control
				Identificación organoléptica	Extracto hidroalcohólico	Ficha de cotejo de parámetros organolépticos	Aspecto Color Sabor Densidad -pH	
				Identificación Física	Solubilidad	Sistema de Solventes	Grado de solubilidad (POCO SOLUBLE) (SOLUBLE) (MUY SOLUBLE)	
				Identificación Química	Flavonoides Fenoles Taninos Saponinas Trisaponas Quinonas Alcaloides	Rx de Sifenada Rx de FeCl3 Rx de Protonas Met. de Espuma Rx Rosenham Rx de Legal Rx de Liebermann Rx de Bornstanger Rx de Dragendorff -Meyer	Blanco Espuma Rojo Verde, Azul Rojo en base H2O Anaranjado-Blanco-Crema	
PROBLEMA ESPECÍFICO	OBJETIVO ESPECÍFICO	HIPÓTESIS ESPECÍFICA	VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADORES	
1. ¿Cuáles serán las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil)?	1. Identificar las clases de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil).	1. El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) presentan varias clases de metabolitos secundarios.	Perfil de seguridad por el método del HET-CAM.					
2. ¿Qué índice de irritabilidad presentarán las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM?	2. Evaluar el índice de irritabilidad que presentarán las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM.	2. Las formulaciones magistrales a diferentes concentraciones elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Melissa officinalis</i> L. (Toronjil) evaluadas mediante el método HET-CAM, presentan bajo índice de irritabilidad		Identificación del efecto irritante	Método del HET-CAM	Modelo de actividad irritante in vitro	Hemorragia Lisis Coagulación	

Anexo 2: Certificado de la especie botánica de la planta de estudio



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

CONSTANCIA N° 044-USM-2019

El JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, OJEA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta con tallo y hojas) recibida de **DANNY ALONSO ANGULO BORBOR**, alumno de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: *Melissa officinalis* L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1998).

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: Melissa

ESPECIE: *Melissa officinalis* L.

Nombre vulgar: "Toronjil"

Determinado por: Dra. Joaquina Adelaida Alcán Castillo

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

Lima, 13 de febrero de 2019



Asunción A. Cano Echevarría
Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Copia:

ANEXO 3: Recolección de la especie vegetal



Anexo 4: Secado, molienda, filtrado y obtención del extracto



ANEXO 5: Prueba de solubilidad



Anexo 6: Tamizaje Fitoquímico



Anexo 7: Elaboración de la crema base con extracción seca de la especie vegetal



ANEXO 8: Aplicación del método HET CAM



