

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA.

**ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD OCULAR AGUDA DE LOS
COLIRIOS DE FLUCONAZOL POR EL MÉTODO HET-CAM EN
HOSPITAL DE EMERGENCIAS VILLA EL SALVADOR 2018**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico
y Bioquímico.**

TESISTA:

BACHILLER: ANDREY QUISPE GUTIÉRREZ

ASESOR:

Dra. Q.F. HEDDY TERESA MORALES QUISPE

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

*A la vida por las duras pruebas que se me presentaron y que
hicieron más fuerte mi voluntad de seguir, de avanzar, de progresar
A mis padres: Daniel Quispe Yucra y Alejandra Gutiérrez Champi por
el amor infinito que siempre recibí, el apoyo constante y por creer
en mí y mis sueños.*

*A mis hermanas y mi hermano por estar conmigo, a las amistades
que conocí en la facultad que compartí tantos momentos tristes
y felices y que hoy se convierten en mis colegas
A esta maravillosa carrera tan noble, que tantas alegrías
me ha regalado*

*A los profesionales que contribuyeron y me apoyaron
en mi formación profesional*

*Para ellos la dedicatoria de mi tesis pues es a ellos a quien
se los debo.*

Gracias

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento sincero a todas las personas que contribuyeron con la realización de esta investigación, en especial para el Q.F Guillermo Gallardo por el apoyo incondicional en esta investigación. A mi compañera de vida Esther Valencia gracias por tanta comprensión en esta etapa de mi vida, A mi amigo de la infancia Salvador H. Villa. que tanto contribuyo gracias amigo.

A mi asesor: QF. Teresa Morales Quispe, por el soporte, por brindarme sus conocimientos sugerencias y continuo apoyo a lo largo de la realización del presente trabajo de investigación.

A los miembros del laboratorio de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

RESUMEN

Nuestra investigación se centra en determinar la toxicidad ocular aguda de los colirios de Fluconazol en diferentes concentraciones elaborado en los servicios de Farmacia Magistral mediante el método Hen's Egg Test-Chorioallantoic membrane (HET-CAM). a fin de proporcionar nuevas alternativas al tratamiento de la Queratitis Fúngica

El objetivo es comparar las diferentes concentraciones de los colirios de fluconazol a 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL y 8 mg/mL con la finalidad de hallar la dosis no tóxica, la dosis más alta permitida para uso oftálmico que no provoque irritación ocular aguda y las dosis tóxicas, con la finalidad de proporcionar una nueva alternativa al tratamiento de la queratitis fúngica.

Los cien (100) huevos fértiles fueron adquiridos de una granja especializada en la crianza y producción avícola ubicada en Villa El Salvador, la incubación fue realizada en una incubadora elaborada artesanalmente según los requerimientos del protocolo de las técnicas *in vitro* en Toxicología (INVITTOX). La elaboración de los colirios a diferentes concentraciones fue realizada en las instalaciones del departamento de Farmacia Magistral del Hospital de Emergencias de Villa El Salvador. Los análisis se realizaron en las instalaciones del laboratorio de especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímica, de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

La metodología empleada se fundamenta en el método Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) propuesta por *Luepke* bajo el protocolo N° 47 de las técnicas *in vitro* en Toxicología (INVITTOX) validadas y reglamentadas por la Unión Europea. En el estudio experimental se busca calcular el índice de irritación (Irritation Score) analizando los potenciales procesos nocivos que pudiesen ocurrir en los vasos sanguíneos de la membrana Corioalantoidea en el embrión en desarrollo durante un lapso de tiempo de exposición de 300 segundos.

Los resultados y conclusiones, en las concentraciones de 2 mg/mL y 4 mg/mL se encontró índice de irritación nulos en ambas muestras, determinando concentraciones no tóxicas y la concentración 4mg/mL como dosis máxima tolerada. que por lo tanto no revela signos de irritación aguda perceptibles. Se considera adecuado para su uso desde un punto de vista toxicológico. En cuanto a las concentraciones de 6mg/mL y 8mg/mL ambas obtuvieron índice de irritación tóxicas severas, siendo dañinas desde un punto de vista toxicológico.

Palabras claves: Fluconazol, HET-CAM, Colirio.

ABSTRACT

Our research focuses on determining acute ocular toxicity of Fluconazole eye drops in different concentrations elaborated in the Pharmacy Master Services in order to provide new alternatives to the treatment of Fungal Keratitis by the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane method (HET-CAM).

The objective is to compare the different concentrations of fluconazole eye drops at 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL and 8mg/mL in order to find the non-toxic dose the highest dose allowed for ophthalmic use. provoke acute ocular irritation and toxic doses, in order to provide a new alternative to the treatment of fungal keratitis.

The 100 fertile eggs were acquired from a farm specialized in poultry breeding and production located in Villa El Salvador, the incubation was done in an incubator made by hand according to the requirements of the protocol of *in vitro* techniques in Toxicology (INVITTOX). The elaboration of the eye drops was carried out in the facilities of the Master Pharmacy Department of the Hospital of Emergencies of Villa El Salvador. The analyzes were carried out in the facilities of the specialty laboratory of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the Inca Garcilaso de la Vega University.

The methodology used is based on the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) method proposed by Luepke under protocol No. 47 of the *in vitro* techniques in Toxicology (INVITTOX) approved and regulated by the European Union. In the pseudo-experimental study, the Irritation Score is calculated by analyzing the possible harmful processes that could occur in the blood vessels of the chorioallantoic membrane of the chicken embryo during an exposure time of 300 seconds.

The results and conclusions, in the concentrations of 2mg/mL and 4mg/mL, no irritation index was found in both samples, determining non-toxic concentrations and 4mg/mL as the maximum tolerated dose. therefore, they do not show signs of acute irritation appreciable, and are therefore considered suitable for their use from the toxicological point of view. Regarding the concentrations of 6mg/mL and 8mg/mL both obtained severe toxic irritation index, being harmful from a toxicological point of view.

Keywords: Fluconazole, HET-CAM, Eye drops.

INDICE

Acta de sustentación

Dedicatoria

Agradecimiento

Abreviaturas

Índice de tablas

Índice de figuras

Índice de anexos

Resumen

Abstract

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.1 Descripción de la realidad problemática	3
1.2 Formulación del Problema	5
1.2.1 Problema general.	5
1.2.2 Problemas específicos.	5
1.3 Objetivos	6
1.3.1 Objetivo general.	6
1.3.2 Objetivos específicos.	6
1.4 Justificación e importancia del estudio.	6
2 CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Antecedentes del estudio	9
2.1.1 Nacionales	9
2.1.2 Internacionales.	16
2.2 Bases Teóricas	19
2.2.1 Queratitis Micótica	19
2.2.2 Fisiopatología	20
2.2.3 Diagnóstico	25
2.2.4 Diagnóstico de laboratorio	27

2.2.5	Frotis corneal ó Examen directo	27
2.2.6	Cultivo	27
2.2.7	Examen histopatológico	27
2.2.8	Tratamiento de las úlceras micóticas	28
2.2.9	Importancia de los ensayos de toxicidad ocular	35
2.2.10	Anatomía del ojo humano	36
2.2.11	Draize prueba de irritación en los ojos	38
2.2.12	Limitaciones y críticas al ensayo de Draize ocular.	40
2.2.13	HET CAM	42
2.3	Hipótesis:	47
2.3.1	Hipótesis general.	47
2.3.2	Hipótesis específicas.	47
2.4	Variables.	47
2.4.1	Tabla de operacionalización de variables.	47
2.5	Marco conceptual	48
3	CAPÍTULO III. MÉTODO.....	50
3.1	Tipo de estudio.	50
3.2	Diseño a utilizar.	50
3.3	Población.	50
3.4	Muestra.	50
3.5	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	51
3.6	Procesamiento de datos	78
4	CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	79
4.1	Presentación de resultados	79
4.2	Contrastación de hipótesis.	104
1	Formulación de la Hipótesis específica I.	105
1	Hipótesis específica II.	105
1	Hipótesis específica III.	106
4.3	Discusión de resultados.	107
5	CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	108
5.1	Conclusiones.	108
5.2	Recomendaciones.	108
	BIBLIOGRAFÍA.	109
	ANEXOS.....	115

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Agentes etiológicos.	20
TABLA 2: Clasificación de Draize.	39
TABLA 3: Clasificación de las sustancias irritantes HET-CAM.	45
TABLA 4: Clasificación de las sustancias irritantes HET TBS.	46
TABLA 5: Resultados de los controles del método Het – Cam / control negativo Suero fisiológico NaCl 0.9% (Grupo IV).	87
TABLA 6: Resultados de los controles del método Het – Cam / Control Positivo I NaOH 0.1N (Grupo IV).	87
TABLA 7: Resultados de los controles del método Het – Cam / Control Positivo II Lauril Sulfato SDS 1% (Grupo IV).	88
TABLA 8: Resultados de los controles del método Het – Cam / estándar colirio de Nafazolina (Grupo IV).	88
TABLA 9: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 2mg/mL (Grupo I).	89
TABLA 10: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 4mg/mL (Grupo I).	90
TABLA 11: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 6mg/mL (Grupo I).	91
TABLA 12: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 8mg/mL (Grupo I).	92
TABLA 13: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 2mg/mL (Grupo II).	93

TABLA 14: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 4mg/mL (Grupo II).	94
TABLA 15: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 6mg/mL (Grupo II).	95
TABLA 16: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 8mg/mL (Grupo II).	96
TABLA 17: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 2mg/mL (Grupo III).	97
TABLA 18: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 4mg/mL (Grupo III).	98
TABLA 19: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 6mg/mL (Grupo III).	99
TABLA 20: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 8mg/mL (Grupo III).	100
TABLA 21: Análisis de resultados por grupos.	101
TABLA 22: Análisis de desviación estándar de los grupos I-II-III.	102
TABLA 23. Análisis de la toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol por el método HET-CAM en hospital de emergencias Villa El Salvador2018.	104
TABLA 24. La toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador.	106

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Capas corneales.	21
FIGURA 2.	Queratitis por <i>fusarium</i> .	23
FIGURA 3.	Queratitis por hongos filamentosos.	24
FIGURA 4.	Queratitis por <i>candida sp.</i>	24
FIGURA 5.	Diagnóstico de queratitis por tinción fluoresceína y luz de cobalto.	26
FIGURA 6.	Anatomía del ojo.	37
FIGURA 7.	Preparación de la membrana Corioalantoidea.	43
FIGURA 8.	Espectro de absorbancia del colorante azul de tripán.	45
FIGURA 9.	Ecuación de la recta de absorbancias de azul de tripán.	46
FIGURA 10.	Elaboración de incubadora.	52
FIGURA 11.	Intercambio de aire en la incubadora.	53

FIGURA 12.	Prueba de densidad: positiva.	53
FIGURA 13.	Prueba de densidad: contaminada.	54
FIGURA 14.	Elaboración de ovoscopio.	54
FIGURA 15.	Incubación de los huevos fértiles seleccionados.	55
FIGURA 16.	Día 1 de la incubación.	56
FIGURA 17.	Sensor de temperatura digital.	57
FIGURA 18.	Sistema de ventilación y volteo automático.	57
FIGURA 19.	Fluconazol USP.	58
FIGURA 20.	Toma de muestra (prueba de solubilidad).	58
FIGURA 21.	Pesado de soluto (prueba de solubilidad).	59
FIGURA 22.	Solvente (prueba de solubilidad)	59
FIGURA 23.	Mezclado y homogenizado (prueba de solubilidad).	60

FIGURA 24.	Soluble en agua (prueba de solubilidad).	60
FIGURA 25.	Pesado de soluto (het cam - colirios)	69
FIGURA 26.	Solutos (het cam - colirios).	61
FIGURA 27.	Frascos ámbar (het cam - colirios).	62
FIGURA 28.	Cámara de flujo laminar.	63
FIGURA 29.	Vertido de solutos y solventes.	64
FIGURA 30.	Homogenización de solutos y solventes.	65
FIGURA 31.	Rotulamos colirios de fluconazol 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL y 8mg/mL.	65
FIGURA 32.	Colirios de fluconazol 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL y 8mg/mL.	65
FIGURA 33.	Departamento de farmacia magistral H.E.V.E.S.	66
FIGURA 34.	Cristales de NaOH.	68

FIGURA 35.	Lauril sulfato de sodio Q.P. (SDS).	68
FIGURA 36.	Pesaje de indicadores.	69
FIGURA 37.	Preparación de los reactivos SDS Y NaOH.	70
FIGURA 38.	Colirios de fluconazol de 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL y 8mg/mL.	70
FIGURA 39.	Abrimos la incubadora y sacamos un huevo.	71
FIGURA 40.	Inicio del método HET-CAM.	72
FIGURA 41.	Procedemos delinear la cámara de aire.	73
FIGURA 42.	Extracción de la cascara.	74
FIGURA 43.	Procedemos a retirar la membrana de la cámara de aire.	75
FIGURA 44.	Huevo infértil.	76
FIGURA 45.	Nuevo huevo.	77
FIGURA 46.	Apertura del huevo fértil.	77

FIGURA 47.	Huevo fértil - membrana Corioalantoidea.	78
FIGURA 48.	Control negativo NaCl 0.9%.	80
FIGURA 49.	Resultado control negativo NaCl 0.9%.	80
FIGURA 50.	Control positivo y resultado de NaOH 1%.	81
FIGURA 51.	Control positivo II y resultado de lauril sulfato de sodio 1N.	81
FIGURA 52.	Prueba het cam colirio de fluconazol de 2mg/mL.	82
FIGURA 53.	Resultado prueba het cam colirio de fluconazol de 2mg/mL.	83
FIGURA 54.	Prueba het cam colirio de fluconazol de 4mg/mL.	84
FIGURA 55.	Resultado prueba het cam colirio de fluconazol de 4mg/mL.	84
FIGURA 56.	Prueba het cam colirio de fluconazol de 6mg/mL.	85
FIGURA 57.	Resultado prueba het cam colirio de fluconazol de 6mg/mL.	85
FIGURA 58.	Prueba het cam colirio de fluconazol de 8mg/mL.	86
FIGURA 59.	Resultado prueba het cam colirio de fluconazol de 8mg/mL.	86

FIGURA 60.	Análisis de los Resultados de los colirios de 6mg/mL de los Grupos I - II – III.	101
FIGURA 61.	Análisis de los Resultados de los colirios de 8mg/mL de los Grupos I - II – III.	102
FIGURA 62:	Análisis de los Resultados de los colirios de 2 mg/mL, 4 mg/mL 6 mg/mL y 8mg/mL de los Grupos I - II – III.	103

ANEXOS

Anexo1:	Matriz de consistencia	115
Anexo2:	Análisis Estadístico	116

INTRODUCCIÓN

Los Químicos Farmacéuticos como profesionales del medicamento, el alimento y tóxico y como tal forma parte del cuerpo médico que se encarga de restablecer la salud de las personas, pero su responsabilidad como profesional también abarca la elaboración de fórmulas magistrales que mejoren la salud de los pacientes.

Actualmente, en el Perú no se comercializan colirios antifúngicos de fluconazol, en consecuencia, este vacío se cubre con la preparación de fórmulas magistrales oftálmicas a nivel hospitalario, reformulando medicamentos comerciales parenterales y ampollas, que no están diseñados ni adaptados a la vía ocular. A su vez se usan medicamentos con márgenes de eficacia reducida que terminan la mayoría de casos en intervenciones quirúrgicas.

Cabe mencionar que la queratitis micótica es una afección de difícil diagnóstico y tratamiento, su manejo es restringido y constituye un reto para la oftalmología debido a la falta de agentes antimicóticos eficaces. El problema de la queratitis micótica en el Perú se agudiza por su ubicación geográfica tropical con un clima cálido, se agrava cuando existe un sustento económico predominantemente agraria, deficiente instrucción sanitaria, automedicación, uso inadecuado de lentes de contacto, recursos económicos escasos

Existen numerosas investigaciones sobre la efectividad, estabilidad y utilización de las formulaciones magistrales oftálmicas, sin embargo, no existen estudios sistemáticos de toxicidad de estas.

El presente trabajo pretende dar un aporte a la sociedad dando a conocer el efecto tóxico que puede causar los colirios de fluconazol en sus diferentes concentraciones con la finalidad de tener un efecto terapéutico adecuado evitando la irritación ocular aguda.

También se pretende dar un aporte a la profesión de Farmacia y Bioquímica, aportando conocimientos en las áreas de toxicología, mejorando el abanico de fármacos oftalmológicos antimicóticos.

Por lo tanto, este tema de estudio sobre el análisis de la toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de Emergencias Villa E I Salvador en el año 2018; la cual se presentaron V capítulos y anexos.

En el **capítulo I** se identifica el problema de estudio.

En el **capítulo II** podemos visualizar el marco teórico, a continuación, se pasa a detallar los antecedentes nacionales como internacionales de nuestra investigación, así mismo encontraremos las bases teóricas y legislativas que respaldan nuestra investigación.

En el **capítulo III** se menciona la técnica que se empleó en el presente trabajo de investigación además del carácter de la investigación y las técnicas que se usaran para la toma de datos.

En el **capítulo IV** se presenta los resultados del estudio y las discusiones de los resultados obtenidos.

En el **capítulo V** finalizando el presente trabajo de investigación encontraremos las conclusiones, y se propone algunas recomendaciones para futuros investigadores en el estudio de referentes a estos temas.

CAPÍTULO I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Descripción de la realidad problemática

En la actualidad la queratitis infecciosa es una patología que sucede regularmente afectando diferentes partes del ojo y es considerada como una de las causas de ceguera no reversible a nivel mundial, con una alta traza de incidencia según datos de la Organización Mundial de la Salud. La inflamación de la córnea causado por las queratitis fúngicas son enfermedades de extrema gravedad, y su tratamiento es complicado además que en varios casos pueden llegar a afectar la visión de manera irreversible¹.

Entre las causas principales, de la queratitis infecciosa, tenemos las lesiones de córnea, el uso de lentes de contacto contaminados, el contacto de los ojos con agua contaminada con virus, bacteria, hongos; además de factores de riesgo como la inmunidad reducida, el uso de gotas oftálmicas corticoesteroides y edad del paciente²

Tradicionalmente los tratamientos más utilizados en la queratitis infecciosa causados por hongos han sido nistatina tópica, que es un antifúngico antiguo para hongos filamentosos y anfotericina B para levaduras, el cual es un antifúngico de amplio espectro³. No obstante aún persisten serias dudas respecto al tratamiento actual, debido a la casi nula penetración intraocular de los antifúngicos mencionados³.

Lo extraño de esta enfermedad, es la ausencia de tratamientos efectivos que estén disponibles en países en vías de desarrollo, adicionalmente la escasez de estudios científicos locales de esta enfermedad, origina un gran reto para el médico oftalmólogo y advierte la necesidad de ejecutar una revisión actualizada de los tratamientos, que se base en la evidencia y con sugerencias claras para un mejor tratamiento de esta enfermedad ³.

En la actualidad, en el Perú no se comercializan colirios oftálmicos antifúngicos para tratar dicha queratitis fúngica, debido a esto en los hospitales se preparan fórmulas magistrales oftálmicas para el tratamiento de esta patología.

Existen varios estudios científicos sobre la eficacia, estabilidad y aplicación de las fórmulas magistrales oftálmicas^{4,5}. Aunque, no hay estudios minuciosos sobre la toxicidad que pueden causar estas fórmulas magistrales. El entendimiento de las formulaciones magistrales, desde el punto de vista toxicológico es primordial para constatar la seguridad y decidir sobre la información conveniente para la elección de tratamientos farmacoterapéuticos⁶

La valoración del riesgo, por el uso de productos químicos, propone la realización de nuevos métodos para la evaluación toxicológica. Los ensayos toxicológicos realizados in vivo , se han usado tradicionalmente en la valoración de la ausencia de peligro mediante la inocuidad y seguridad de los componentes cosméticos.

No obstante, en la actualidad se está criticando el uso de estos ensayos toxicológicos debido a los altos costos en su realización, ya que va aumentando el cuestionamiento de las conductas éticas en la industria cosmética.⁷

El avance de estos ensayos toxicológicos, y la actual demanda social y legislativa, da pie a la regla de las tres “erres” (RRR): Reducción, Refinamiento y reemplazo utilizados para cuidar el medio ambiente reduciendo los residuos generados.⁷

En la actualidad se están dedicando esfuerzos y medios, en la búsqueda de nuevos estudios para la realización de ensayos toxicológicos usando el análisis in vitro , y así fomentar la disminución en el uso de ensayos in vivo , por ende reducir la utilización de animales en pruebas de control toxicológico y de sustancias⁸.

Los estudios de ensayos de irritación ocular y dérmico aplicados en conejos, conocido como test de Draize, son frecuentemente utilizados, pero a la vez muy criticados⁷.

El método de Draize es usado debido a la similitud del ojo del conejo con el del ser humano, pero con numerosos aspectos fisiológicos distintos. Estas diferencias fisiológicas además de la subjetividad para valorar un mismo producto entre distintos laboratorios, y que la sustancia de prueba causa irritación, dolor, ulceración y hasta necrosis de las estructuras oculares hacen lógicas las objeciones a este tipo de ensayo⁷. Sin embargo, recientemente este tipo de ensayos está disminuyendo, debido a que muchos investigadores están rechazando realizar ensayos in vivo debido a la atrocidad de estos métodos en los animales y están optando por los ensayos in vitro , ya que se logra una mayor correlación de resultados con el ser humano, que con los ensayos en animales y así evitar la exposición innecesaria de productos tóxicos en estos⁸.

En la actualidad, un número importante de laboratorios están insertando en sus investigaciones el ensayo de membrana del huevo de gallina denominado HET-CAM para evaluar la irritación ocular inducida por diferentes sustancias, este método resulta más eficaz debido a su rapidez, sencillez, sensibilidad⁹.

Con el fin de aumentar las alternativas ante esta enfermedad elaboraremos los colirios de fluconazol tomando como base los conocimientos de farmacia magistral a su vez evaluaremos las concentraciones terapéuticas desde el punto de vista toxicológico apoyándonos en el método HET-CAM (test de irritación ocular).

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 Problema general.

1. ¿A qué concentración los colirios elaborados a base de fluconazol presentaran toxicidad ocular aguda, mediante el método HET-CAM?

1.2.2 Problemas específicos.

1. ¿Los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*) de proveedor comercial presentaran los estándares de calidad según el protocolo 47 HET-CAM propuesto por Luepke?
2. ¿Existen toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador?
3. ¿El colirio elaborado con fluconazol será más tóxica que el colirio de Nafazolina (fórmula magistral comercial)?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general.

1. Determinar a qué concentración los colirios elaborados a base de fluconazol presentaran toxicidad ocular aguda, mediante el método HET-CAM

1.3.2 Objetivos específicos.

1. Evaluar la calidad de los huevos de gallina obtenidos de proveedor comercial, ¿según el protocolo 47 HET-CAM propuesto por *Luepke*.
2. Analizar la toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL por el método HET-CAM.
3. Evaluar concentración tóxica de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina (fórmula magistral comercial).

1.4 Justificación e importancia del estudio.

La ejecución de la presente investigación es de interés de salud pública porque brinda una alternativa con sus respectivas dosis terapéutica y tóxicas para el tratamiento de afecciones oculares fúngicas como la queratosis ocular.

La investigación es importante porque va dirigida para preservar la salud de la población, mejorar el abanico de fármacos a usar frente a enfermedades fúngicas oculares, siendo causantes en su mayoría de ceguera irreversible en la actualidad.

La ventaja de las pruebas *in vitro* sobre las pruebas *in vivo* es por su sencillez, rapidez y la medición de los parámetros finales, de tal manera que se reduce el número de animales usados y disminuye el dolor y estrés causado en los animales de experimentación. Por lo tanto, se emplea este método que es poco conocido, pero a la vez resulta efectivo para determinar el efecto toxicológico irritante causado por diferentes sustancias.

El método HET CAM está validado y estandarizado y es usado en varios estudios como por ejemplo el ensayo fase III que se utiliza para verificar si un tratamiento nuevo es seguro al compararlo con un tratamiento patrón, a su vez el método cuantitativo CAM-TBS se usó en el proyecto "Estudios sobre los métodos de ensayo para evaluar la seguridad de nuevos ingredientes de los cosméticos " siendo actualmente el método Het Cam validado y aceptado internacionalmente rescatando su carácter humano y ecológico.

Es factible, porque se puede realizar en nuestro país, además los costos de investigación son relativamente bajos y los reactivos y materiales son fácil adquisición.

Es viable ya que se cuenta con las muestras y materiales de estudio, además La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Inca Garcilaso de la Vega cuenta con los laboratorios de especialidad para desarrollar este proyecto.

Es actual, porque mediante a esta técnica los principales beneficiarios de esta investigación será la población de la ciudad de Lima y del interior del país, a su vez los países de zonas tropicales, en términos generales la población en riesgo.

Esta información constituye un punto de partida para la realización de investigaciones futuras en el campo de la toxicología de medicamentos y la sustitución de técnicas invasivas que perjudican a los animales de experimentación.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

2.1.1 Nacionales

Ruiz C. et al (2013); realizó el estudio “**Evaluación del potencial irritante de la crema cosmética "baba de caracol & concha de nacar" comercializada en el mercado de belén en *Oryctolagus cuniculus* cepa New Zealand**” se tuvo como objetivo determinar si la crema cosmética causa eritema y escaras en la piel de conejo además de la formación de edema y el daño celular, el potencial irritante primario se evaluó de acuerdo a la escala del Test de Draize. Se usó conejos albinos machos con un peso de 2 kilogramos. Se aplicó 0.5 gramos de la crema en un área de 5 x 5 cm y fue fijado con un esparadrapo. Se formaron tres grupos el primero es el control negativo donde se usó vaselina, el segundo grupo llamado control positivo se usó formaldehído al 98 % y el tercer grupo se usó la muestra problema. Las conclusiones fueron que la crema cosmética baba de caracol provoca eritema ligero de grado 1 casi no perceptible, además no irrita la piel y no provoca edema. Según los resultados obtenidos a nivel macroscópico la crema cosmética, no presentó potencial irritante y a nivel microscópico queratosis en la piel de grado leve, por ende, la crema está permitida para su uso.

Taype E. (2015); realizó el estudio “**Estandarización y validación del método de Het- Cam para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de los cinco frutos nativos del Perú**” se efectuó la normalización y validación del método HET CAM cuantitativo y cuantitativo (CAM- TBS) en 5 frutos autóctonos del Perú.

Taype cita bases científicas de los protocolos HET CAM cualitativo y el método HET CAM cuantitativo llamado CAM-TBS, experimentando con frutos autóctonos del Perú, siendo estos: Tumbo serrano, Aguaymanto, Camu camu, Aguaje y Cocona.

También señala la importancia del método Het Cam como alternativa al test de Draize.

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (USMP) donde se desarrolló los procedimientos de validación y estandarización

En el proceso de validación método HET CAM (cualitativo) y el método cuantitativo llamado CAM-TBS de los extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicólicos se estableció que los parámetros sometidos a ensayos estadísticas manifestando que el método HET CAM del tipo cuantitativo da como resultado que la medida de la irritabilidad ocular in vitro es del tipo lineal además de preciso y exacto pero no tuvo como respuesta ser robusto a nivel de laboratorio.

Kuch G. et al (2014) realizó un estudio llamado **“Evaluación del potencial irritante del aceite esencial de aniba rosaeodora ducke “palo de rosa” en *oryctolagus cuniculus* cepa new zealand – Iquitos, 2014”** debido a la aparición de nuevos insumos para la industria cosmética se realizan estudios para verificar los daños que puedan causar a la piel al ser usados por ello, se evaluó el potencial irritante del aceite de palo rosa utilizando la escala de la prueba de Draize que evalúa las lesiones dérmicas en conejos albinos de 2 kg de peso.

Se depiló a los animales 24 horas antes de iniciar el experimento, se aplicó 0.5 mL del aceite a experimentar en tres conejos, como control negativo se usó vaselina y como control positivo se usó formaldehído, luego de 4 horas se lavó la piel con solución salina. Los resultados obtenidos se realizaron y mostraron de manera estadística. Se observó la formación de

eritema y edema de acuerdo al método del test de Draize, además se realizó cortes histológicos para ver el grado de lesión dérmica causado.

Los resultados fueron que el aceite de palo rosa no presenta un potencial irritante ni formación de edemas en la piel de los conejos, solo se evidencio una formación de eritema de grado uno, se recomienda realizar estudios de toxicidad dérmica o efectos carcinógenos.

Pipa M. et.al. (2015) realizo “El ensayo *in vitro* sobre la irritabilidad ocular mediante el método de HET-CAM en cinco mucilagos de vegetales”. El objetivo de este estudio es para hallar el efecto de la decocción de las semillas de 5 vegetales en la irritabilidad ocular por el metoo Het –Cam de forma *in vitro*.

La identificación de las plantas se realizó por un biólogo con especialidad en botánica. Las semillas de las 5 plantas fueron extraídas y colocadas a la temperatura del medio ambiente, una vez que las semillas se encuentran secas, se extrae el mucilago por el método de decocción. Se utilizaron reactivos como el ácido orgánico oxálico, el ácido tánico que está formado por glucosa y fenoles, el compuesto cristalino acetato de plomo neutro y básico. Se utilizaron las concentraciones de los reactivo a 1 %, 10 y 100%. Se usó dos controles positivos de hidróxido de sodio al 0.1 N y un control negativo de cloruro de sodio al 0,9%.

Para la realización del método HET-CAM se usó las membranas corioalantóicas fértiles provenientes de huevos de gallina de la raza roca blanca, después de diez días de ser incubado de forma artificial se aplicó sobre las membranas la sustancia a experimentar, para poder observar la irritabilidad estereoscopia ocular

El mucilaje de la semilla de membrillo dio positivo debido a la formación de precipitado en comparación con los reactivos para la identificación cualitativa mucílagos. Los resultados del método HET-CAM mostraron el nivel de irritabilidad causados por el mucilaje de las cuatro especies de semillas las cuales dieron como resultado la característica de no irritable.

Eulogio J. et.al. (2015) realizo el estudio sobre **“Variante del ensayo de la membrana Corioalantoidea (cam-tbs) para la evaluación de irritabilidad oftálmica in vitro Del mucílago de cydonia vulgaris var. Oblonga (mill) d.c. “membrillo”** utilizo una modificación del método de membrana corioalantóica del huevo para evaluar la irritación ocular de la decocción de semillas de forma *in vitro* para uso terapéutico, debido a su velocidad, sencillez, sensibilidad, se utilizó la ejecución fácil y su bajo costo relativo.

El grupo control positivo contenía hidróxido de sodio y el control negativo contenía cloruro de sodio y para la sustancia problema se usaron tres diluciones de la decocción de las semillas. Se aplicaron todos los grupos tratados en las membranas coriolantóicas provenientes de los huevos de pollo con diez días de incubación de forma artificial.

Se determinó que el mucilaje obtenido de la decocción de semillas de Molino y Marmelo no poseen actividad irritante

Celestino F. et.al. (2018) realizo el estudio **“Evaluación de la irritabilidad ocular *in vitro* mediante el método HET-CAM en cremas para contorno de ojos con y sin registro sanitario que se comercializan en el distrito de la victoria, la parada - lima.”** La piel alrededor de los ojos es más frágil y a largo plazo el uso de cremas cosméticas puede causar irritación inflamaciones y hasta cáncer, debido a la utilización de componentes químicos en las cremas que han causado alerta mundial. Debido a esto el objetivo del estudio es evaluar la irritabilidad del contorno de los ojos causados por cremas que tienen registro sanitario y las que no cuentan con el registro. Mediante el método de Het Cam cualitativo y cuantitativo se usa para poder observar la irritación ocular de la membrana Corioalantoidea causado por productos cosméticos, este método es novedoso y recién se está utilizando en laboratorios de nuestro país. También compararemos el nivel de irritabilidad de las cremas con registro sanitario y las que no tengan registro sanitario, además de observar el grado de daño causado ya sea

por lisis o inflamación. Las cremas con registro sanitario usados son: crema Portugal contorno de ojos, crema barbaria, crema cicatricure, crema nivea y crema ponds. Las cremas sin registro sanitarios adquiridas en tiendas de la Victoria son: crema concha de Nacar, crema de sabila, crema Baba de caracol, crema Rosa Mosqueta y crema aloe vera.

Como control negativo se usó suero fisiológico, como control positivo se usó Lauril sulfato con una clasificación de irritante moderado, hidróxido de sodio con una clasificación de irritante severo, etanol y propilenglicol con una clasificación de irritante leve.

Los resultados fueron que las cremas sin registro sanitario son altamente irritantes para el contorno de ojos, mientras que las cremas que tienen registro sanitario poseen una irritabilidad leve y son seguros.

Mendoza D. et.al. (2013), realizo el estudio “**Composición química y capacidad anti-irritante de extractos de cuerpo entero de *ulomoides dermestoides* (coleoptera, tenebrionidae)**”. Este escarabajo en américa del sur es usado como afrodisiaco y también en el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Los escarabajos se identificaron en la faculta de entomología de la universidad de Colombia, se prepararon extractos metanólico y hexanicos. Todos los extractos se mantuvieron sellados hasta su próxima utilización.

Asimismo se determinó la composición química de extractos metanólicos y hexenales por GC acoplada a espectrometría de masa "GC-MS" y acción anti-irritante fue evaluada por la prueba de irritación de la membrana Corioalantoidea de huevos fértiles (HET CAM). Siendo el índice de irritación IR se expresa como un resultado.

Estableció 6 mezclas generales de los dos extractos hechos: ácidos grasos, palmítico, esteárico, linoleico, oleico y limoneno.

Los extractos presentaron compuestos volátiles, que son característicos de las defensas de los escarabajos, también se encontraron ácidos grasos y terpenos. Concluyendo con la investigación, la acción anti-irritante fue

determinada por los extractos metanólicos de *U. dermestoides*. Podría asignarse como un compuesto de acción antiinflamatoria como el ac. Oleico y linoleico.

Inocente M. et.al. (2013), “Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de *camu camu*, mediante el método Het Cam”. En la búsqueda de ensayos toxicológicos alternativos se está usando actualmente el método de HET-CAM en la industria farmacéutica cosmética.

Utilizaron fórmulas como cremas, gel y loción los cuales tiene como componente el extracto de camu camu a diferentes concentraciones, que fueron desarrollados por el laboratorio ARYU COSMETIC; se utilizó el ensayo *in vitro* de la membrana Corioalantoidea en huevos de gallinas fértiles Het Cam. La investigación fue realizada en el Centro de Investigación en Medicina Tradicional y Farmacología de la Universidad san Martin de Porres (USMP), En la Facultad de Medicina Humana.

Como control negativo se usó suero fisiológico y para el control positivo se usó hidróxido de sodio y Lauril sulfato los cuales son irritantes severos.

Se concluyó que el índice de irritación establecido en la prueba de las formulaciones cosméticas con extracto de camu camu fue aprobado para determinarlas como no irritantes y constituye el soporte de la seguridad para pruebas posteriores de eficacia clínica del etanol. ⁽⁹⁾

Fernández A. et.al. (2014), “Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM”. Realizo la investigación toxicológica mediante la prueba de HET-CAM; Fluconazol 2 mg/mL y Voriconazol 10 mg/mL los cuales son utilizados para la elaboración colirios para la terapia de queratitis fúngica preparados por el departamento de farmacia magistral (Galénica)

El fundamento de la investigación es la observación de los daños causados en los vasos sanguíneos de la membrana Corioalantoidea usando el método HET CAM en un tiempo de 300 segundos resultando un índice de

irritación (IS, Irritation Score). Concluyendo sin la obtención IS en ambas muestras de tal manera que no hay indicios de irritación aguda notablemente desde el punto de vista toxicológico se fundamenta idóneo para su uso.

Churampi M. (2015), realizo el estudio titulado **“Determinación 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”.**

Según el autor el “tumbo serrano” posee propiedades farmacológicas, presentando compuesto polifenolicos (flavonoides) con propiedades antioxidantes.

Se realizó la marcha fitoquímica el extracto, y un análisis cromatográfico.

Se usó el extracto a concentraciones que varían entre 500 a 1000 ug demostrando que “tumbo serrano” presentó actividad antiinflamatoria al 20% del extracto etanólico. Se observó ligero el potencial irritante con el método Het cam.

Concluyendo que la muestras analizadas del extracto de Passiflora mollissima (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” presentó actividad antiinflamatoria y seguridad y cumple los estándares como activo biológico en la industria cosmética.

2.1.2 Internacionales.

Martínez O. (2007) realizó el estudio titulado “**Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos *in vivo* aplicado al estudio de tensioactivos del tipo lipoaminoácido**”.

En la actualidad los laboratorios están en la búsqueda de nuevos métodos que sean seguros y eficaces, el método de Draize está siendo reemplazado con métodos alternativos para la valoración de la irritabilidad ocular y dérmica. Los tensioactivos se encuentran presentes en la industria cosmética, en productos de limpieza y productos alimentarios, estos tensioactivos causan irritabilidad cuando se aplican en mucosas o partes dérmicas porque solubilizan lípidos, por lo tanto su estudio es importante ya que determina la causa de irritación en su uso.

El trabajo realizado busca nuevos tensioactivos a partir de aminoácidos que disminuyan la irritación dérmica y ocular, además se usaran métodos distintos al ensayo de Draize por motivos éticos.

Los ensayos para evaluar la irritación ocular fue el ensayo de hemólisis *in vitro* para evaluar la irritabilidad causada por tensioactivos, además que es un ensayo sencillo y barato. También se usó el ensayo de Het- Cam y Het- Cam tbs que usa la membrana Corioalantoidea del huevo de gallina, donde se observó hemorragia, vasoconstricción y coagulación. También se usó el ensayo para evaluar la irritación dérmica, citotóxica de líneas celulares.

Las conclusiones determinaron que en ensayo de irritación ocular los tensioactivos resultaron con un grado leve de irritación, el método de HET-CAM resultó muy sensible por lo que se descarta su uso para la prueba de irritabilidad de tensioactivos.

Las cremas evaluadas fueron crema de sábila, crema de propóleos y crema de manzanilla, se utilizaron huevo con 10 días de incubación, se aplicó 0.3 gramos de la sustancia a experimentar en la membrana Corioalantoidea, como control positivo se usó el hidróxido de sodio de 0.1 N y dodecil sulfato de sodio al 1 %. se utilizó cuatro grados para ver la

irritabilidad: ninguna, débil, moderado y fuerte. Y se detectó el daño con el colorante azul de tripán. Los resultados para todas las cremas evaluadas fueron ninguna lo que significa que las cremas elaboradas por el laboratorio de cosméticos Villa Clara son seguros y eficaces.

González M. et.al. (2006) “Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método *in vitro* en sustitución de la prueba en conejos”

En la industria cosmética para probar la irritación ocular se usa el método de Draize el cual está siendo cambiando por métodos alternos debido a cuestiones éticas en el uso de animales de experimentación. En la actualidad varios laboratorios están usando el método de HET-CAM donde se evalúa la irritación ocular en la membrana Corioalantoidea del huevo de gallina.

Buitrago T. et.al (2013), “Generalidades de Queratitis Micótica”. El objetivo de la investigación es aclarar y profundizar en el panorama que abarca la queratitis micótica, analizando de epidemiología, etiología, factores riesgos, fisiopatología, análisis clínico, diagnóstico, tratamiento farmacológico y quirúrgico. Profundizando en el tratamiento farmacológico de los principales fármacos usados en la terapéutica.

Las infecciones causadas por hongos generalmente son producidas por *Fusarium*, *Aspergillus* o *Candida*, están causando la inflamación de la córnea causando un daño superficial la cual no genera cicatrices al momento de curarla y a queratitis profunda que luego de curarse pueden quedar cicatrices

El tratamiento que comúnmente se usa para los tipos de hongos filamentosos es la Natamicina y para las queratitis causadas por *Candida* *sp* se usa Anfotericina B, pero a pesar de su tratamiento no se sabe con efectividad su eficacia ya que estos antifúngicos no penetran la córnea debido a esto su manejo es muy complejo, además que se ha detectado

que para la eliminación del hongo se ha necesitado de 80 días, por ello se recomienda usar coadyuvantes para tratar este tipo de infecciones.

Corrado, M. (2012), presentó el estudio titulado; “Comparative evaluation between oral mucosal hamster irritation test and Het - cam”. La investigación busco usar el método HET-CAM (membrana Corioalantoidea) como alternativa al cuestionado método Draize

Corrado determino el potencial de irritación de unos dentífricos de uso adulto, confiscados por las municipalidades de rio de Janeiro (Brasil)

Además, uso el método *in vivo* de irritación de mucosas oral. Clasificando su resultado según su potencial de irritación como días y los enfrento a la prueba *in vivo* de irritación de mucosas oral en hamsters. Clasificando su resultado según su potencial de irritación como no irritante (NI), mínimamente irritante (IMIN), irritante leve (IL), irritante máximo (IM) e irritante severo (IS), para el método HET-CAM uso la escala de potencial de irritación propuesta por el método oficial INVITOX (*InVitroTóxicology*) en huevos fértiles incubados.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Queratitis Micótica

La queratitis micótica en el siglo pasado fue difícil de diagnosticar y tratar. En la actualidad la queratitis infecciosa es una de las causas de ceguera en el mundo, según datos de la OMS ¹. el primer caso de queratitis micótica fue descrito en 1879 en una úlcera corneal causada por el hongo *Aspergillus spp.* La cornea, el humor vítreo y la retina son las partes que más afectadas por este tipo de infecciones. la palabra queratitis se utiliza para cualquier proceso inflamatorio en la cornea¹⁴.

La queratitis causada por hongos es de importancia mundial ya que causa secuelas irreversibles como es la ceguera y el daño total del ojo ¹⁵⁻¹⁶.

Para que pueda el hongo introducirse necesita de una parte ulcerada ya que sus filamentos no pueden penetrar un epitelio corneal integro por ello necesitan una abrasión o daño epitelial integro.

Generalmente se da en regiones tropicales y países en vía de desarrollo, donde la mayor población afectada es la que trabaja en un ambiente rural ¹⁹⁻²⁰. Sin embargo, se ha observado un incremento de frecuencia en la población urbana, debido a esto ya no es exclusivo de los casos donde se producía infección abundante del hongo al estroma corneal. ²¹⁻²².

Existe dificultad para tratar la queratitis micotica ya que primero se debe identificar al hongo, además de que existe poca disponibilidad de los fármacos para este tipo de tratamiento por otro lado tambien existe el error al identificar el tipo de queratitis de parte del personal médico y esto produce lentitud en el manejo medico causando unas secuelas severas.

TABLA 1: AGENTES ETIOLÓGICOS

Principales hongos causantes de las queratitis micóticas:
Hongos Filamentosos: <i>Fusarium Sp</i> , <i>Aspergillus Sp</i> , , <i>Penicillium Sp</i> , <i>Paecilomyces Sp</i> , <i>Pseudallescheria Sp</i> , <i>Cylindrcarpon Sp</i> , <i>Beaveria Sp</i> , <i>Cephalophora</i> , <i>Velutella</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Mirathecum</i> , <i>Ustilago</i> , <i>Tritirachium</i> , <i>Epidermophyton</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Diplosporium</i> , <i>Curvalaria</i> , <i>Bipolaris</i> , , <i>Exophiala</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Philophon</i> , <i>Fonsecaea</i> , <i>Lasidiplodia</i> , <i>Colleotrichum</i> , <i>Phoman</i> .
Levaduras: <i>Candida Sp</i> , <i>Rhodotorula Sp</i> , <i>Trichosporon Sp</i> , <i>Cryptococcus Sp</i> , <i>Rhodosporium</i> ,
Hongos dismórficos: <i>Blastomyceles</i> , <i>Paracoccidiodes</i> ,

Las queratitis fúngicas generalmente están causados por los hongos filamentosos como es el caso de *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium solani*. Aparecen en personas jóvenes que trabajan en un ambiente rural. Los hongos no pueden penetrar el epitelio de la córnea por lo que necesitan extender sus filamentos en una cornea dañada por un material orgánico que puede ser de origen vegetal o animal, y es el responsable de implantar los conidios en el epitelio corneal.

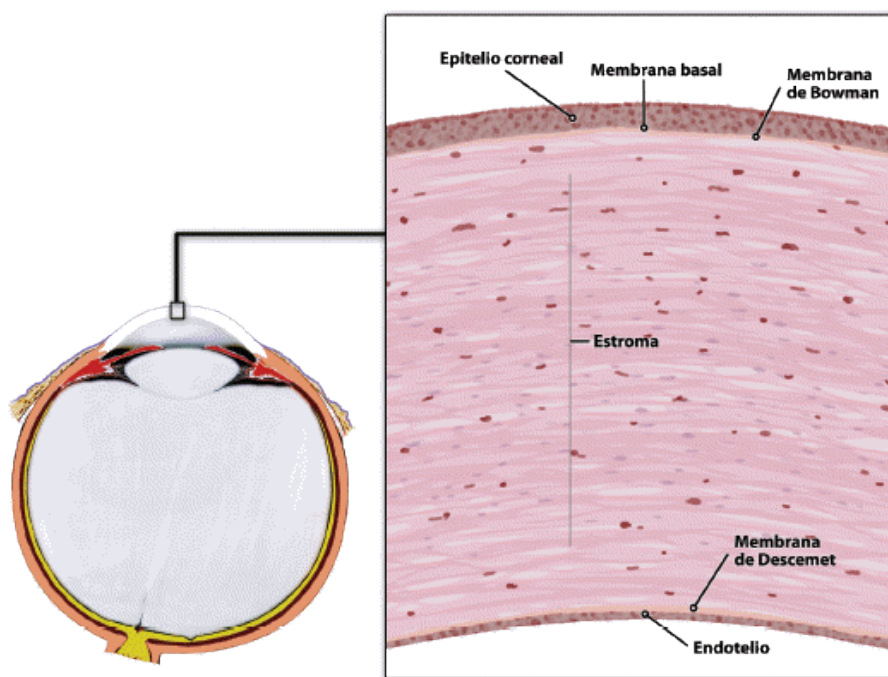
No necesariamente la infección de hongos se da por el uso de corticoides o antibióticos de amplio espectro. Pero si el tipo de lluvia, humedad y viento si influyen en el tipo de hongo que infecta la córnea. Por último, el uso de lentes de contacto son factores predisponibles ya que hay casos donde se ha aislado hongos de la especie *Fusarium* en los lentes de contacto.²³

2.2.2 Fisiopatología

Para comenzar a comprender la fisiopatología corneal, veremos la anatomía de la córnea: Los tejidos de la córnea comprende 5 capas. La primera capa llamada epitelio, que es el estratificado no queratinizado tipo escamoso tiene de 4 a 7 capas de células se aplanan a medida que estén más superficial. Debajo de estas capas se encuentra la membrana o capa superior de Bowman, que es una capa sin células hecha de colágeno colocadas al azar; Aquí están las terminaciones nerviosas que forman el epitelio. Estas terminaciones nerviosas no se regeneran cuando son dañadas. La siguiente capa es la más gruesa

llamada estroma y está formado por fibras de colágeno organizadas en paralelo, lo que le da a la córnea la apertura característica. Debajo del estroma está la membrana Descemet, también conocida como la lámina posterior; Está formado por varios tipos de colágeno y organizado en forma hexagonal que le da una gran durabilidad. Por último, el tejido endotelio es la capa interna, que consiste en una monocapa de células hexagonales que son incapaces de regenerarse, mantiene hidratado de la capa superpuesta, que también es importante para mantener la parte transparente de la córnea.

FIGURA 1: CAPAS CORNEALES.



En la imagen se puede apreciar las capas corneales: epitelio corneal, membrana basal, membrana de bowman, estroma, membrana de descemet y endotelio.

Buitrago Torrado et al (2013). Generalidades de Queratitis Micótica [Rev. Univ. Ind. Santander. Salud]. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072013000300006&nrm=iso

La córnea desarrolla un proceso inflamatorio se debe a que es avascular; Esto causa los procesos inflamatorios que se originan en el limbo y terminan en opacificación corneal. Otro elemento importante de la córnea es su transparencia, que se pierde durante la queratitis puesto que la estructura adecuada y el equilibrio de electrolitos ²⁷. Adema como se sabe el hongo no

puede penetrar una cornea intacta, sino que necesita de una lesión previa en la córnea, una vez que el hongo logra encontrar esta lesión extienden sus filamentos adentrándose en lo profundo de la córnea. ²⁸

Se han identificado dos procesos de queratosis bien marcados, el primero es la infección en pacientes sanos y que tuvieron un contacto traumático con un material vegetal y el hongo ingresa por el epitelio dañado donde se multiplica y causa una reacción inflamatoria, la segunda infección se da en pacientes con la córnea debilitada y generalmente es infectada por hongos del tipo levadura como *cándida*. ^{27.28}

La respuesta inmune es lenta debido a que los hongos no liberan sustancias quimiotácticas, por el contrario, los hongos del tipo levadura liberan fosfolipasa y liso fosfolipasa en la superficie de blastoporos lo que ayuda a la entrada en el tejido del hongo *Fusarium solani* el cual es un hongo muy virulento y se extiende en la córnea.

Evolución

Generalmente los síntomas son difusos, suele tardar entre 6 a 10 días más la aparición de los síntomas con respecto a la queratosis bacteriana ²⁹.

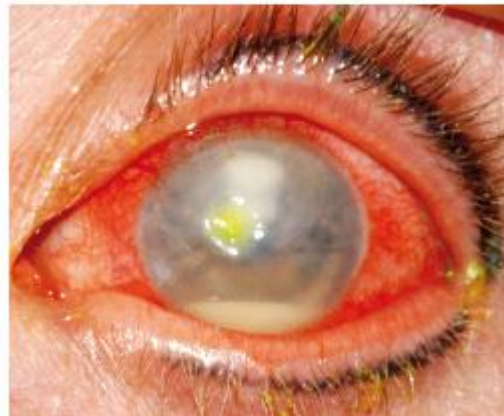
Teniendo presente los factores de riesgo anteriores es necesaria para identificar la presencia de enfermedad ocular relacionada anterior o sistémica, por alcanzar una gestión integral.

El dolor y disminución de la agudeza visual son los principales síntomas por el cual los pacientes se acercan a las consultas médicas. Otros síntomas comunes son hiperemia ciliar en grados variados, blefarospasmo, el rechazo a la luz y la abundante secreción de lágrimas. ²⁷.

En la figura 3 se observa la formación de la placa endotelial en la primera semana, estas varían dependiendo de la especie de hongo infectado en la córnea ²⁵. Las queratitis causadas por el hongo filamentoso *Fusarium solani* puede destruir todo el ojo en dos semanas, ya que la infección es generalmente grave, con perforación profunda y puede causar un glaucoma maligno. Las especies de hongos filamentosos de *Aspergillus* causa una queratitis menos

agresiva y menos grave que ya la anteriormente plateada, que es a su vez más susceptible a la terapia antifúngica de la queratitis *Fusarium*, otros estudios indican que *Aspergillus* queratitis produce a una mayor frecuencia de la ceratoplastia que la queratitis causada por el hongo filamentoso *Fusarium*. Las infecciones causadas por especies de hongos del tipo *Curvularia* generalmente se presenta como una infiltración en la parte superficial con forma de algodones, causando secreción focal de forma lenta.

FIGURA 2: QUERATITS POR *FUSARIUM*



Queratitis por *Fusarium*, nótese el hipopion además la ulcera corneal paracentral infiltrado alodonoso y bordes algo limitados con menor opacidad en la periferia.

Buitrago Torrado et al (2013). Generalidades de Queratitis Micótica [Rev. Univ. Ind. Santander. Salud]. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072013000300006&nrm=iso

FIGURA 3: QUERATITIS POR HONGOS FILAMENTOSOS



El cuadro clínico producido por levaduras es diferente y se presenta como una pequeña úlcera oval de bordes bien definidos, rodeada de un anillo amplio y denso con edema e infiltración corneal ²⁶.

Buitrago Torrado et al (2013). Generalidades de Queratitis Micótica [Rev. Univ. Ind. Santander. Salud]. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072013000300006&nrm=iso

FIGURA 4: QUERATITIS POR CANDIDA



Buitrago Torrado et al (2013). Generalidades de Queratitis Micótica [Rev. Univ. Ind. Santander. Salud]. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072013000300006&nrm=iso

2.2.3 Diagnóstico

Para poder actuar a tiempo es necesario la identificación precoz de tipo de agente causal. La experiencia del médico es crucial para diferenciar entre diferentes tipos de queratitis no infecciosa y queratitis microbiana, esta última lo excluye o confirma por los hongos y luego decide si se trata de un hongo filamentoso o del tipo levadura.

La identificación del cuadro clínico muchas veces es lenta debido al crecimiento lento en los cultivos de laboratorio y en segundo lugar por la poca disponibilidad de acceder a la cornea ya que hace mas difícil su intervención de manera temprana y trae mayores daños al paciente.

En general, el diagnóstico inicial de queratitis fúngica se basa en la tinción de Gram y Giemsa, que tiñe la pared micótica y el citoplasma. La solución de KOH digiere parcialmente los componentes de la proteína fúngica. Se puede usar algo de decoloración tópica en la córnea para identificar y delimitar rápidamente los defectos corneales, como la fluoresceína, y se observa mejor en el biomicroscopio con luminiscencia de cobalto.

FIGURA 5: DIAGNOSTICO DE QUERATITIS POR TINCION FLUOROCEINA Y LUZ DE COBALTO.



De arriba abajo, ojo izquierdo con ulcera corneal sin tinción luego teñido con fluoresceína visto con luz blanca, al final observado con luz azul de cobalto.

Buitrago Torrado et al (2013). Generalidades de Queratitis Micótica [Rev. Univ. Ind. Santander. Salud]. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-080720130003000006&nrm=iso

Los nuevos avances tecnológicos permiten confirmar de manera certera el tipo de infección mediante el uso de métodos como la detección inmunológica, sondas de ácido nucleicos y por el método de reacción en cadena de la polimerasa llamada PCR.

2.2.4 Diagnóstico de laboratorio

2.2.5 Frotis corneal ó Examen directo

Una de las técnicas usadas para poder diagnosticar la queratitis fúngica es el frotis directo que consiste en un raspado profundo de la cornea que puede darse mediante la paracentesis de la córnea de la cámara anterior al globo ocular o también la biopsia corneana, después se usan los activos sobre los frotis del examen directo, siendo el tinción más usada la coloración de gram, el hidróxido de potasio, tinción Giemsa azul de lactofenol, naranja de acridina, hematoxilina y el colorante rojo eosina, que tienen una sensibilidad alrededor de 50% a 80%, mediante esta técnica se determina la presencia de este cuadro clínico^{30, 31}.

2.2.6 Cultivo

Para el empleo de esta técnica se usa comúnmente el agar sangre de chocolate, agar Sabouraud sin el inhibidor cicloheximida y el medio caldo tioglicolato. El raspado debe ser una cornea dañada, siendo el tiempo de incubación muy variable según la cepa de levadura, esta técnica es muy complicada y limitada de usar por el rápido avance de esta enfermedad²³. Debido a esto un paciente no puede esperar todo este tiempo para el inicio de la terapia por ello se recomienda terapias generales para evitar el daño tisular de la córnea.

2.2.7 Examen histopatológico

Esta técnica requiere de un personal altamente especializado en el reconocimiento histológico de los hongos, la morfología de hongos y a su vez poder discernir entre diferentes especies de levaduras, la técnica se fundamenta principalmente en la biopsia corneal, seguido del examen histopatológico mediante el uso de la tinción del reactivo de ácido lácteo Schiff.

2.2.8 Tratamiento de las úlceras micóticas

El inicio rápido del tratamiento es crucial porque incluso un retraso puede influir en el resultado visual final ya que se necesita de un diagnóstico rápido, pero también de la administración de un tratamiento antifúngico adecuado para evitar daños futuros.^{23, 35}

Hasta el momento, no existe un estándar para diagnosticar y posteriormente dar tratamiento de esta cruel afección, cabe recalcar que la baja frecuencia de la enfermedad y al número de pacientes involucrados, dificulta la realización de ensayos clínicos, especialmente en los países desarrollados.

Manejo Farmacológico

Los antimicóticos son los principales fármacos usados en la queratitis micóticas. El trasplante de córnea o queratoplastia es generalmente reservado para el tratamiento de emergencia de la perforación de la córnea y la rehabilitación visual después de la cicatrización de la córnea.

Cuando los hongos penetran las capas profundas de la córnea, es cuadro clínico se agrava, lo que hace menester que los medicamentos empleados posean una óptima penetración tanto corneal como intraocular, sin embargo, son escasos los fármacos con estas características. Se dispone de diferentes grupos terapéuticos en el manejo de esta afección, dentro de las cuales son: polienos (anfotericina B, nistatina, y natamicina), azoles (fluconazol, voriconazol, ketoconazol, econazol, miconazol, itraconazol), (terbinafina) y equinocandinas (caspofungina).^{16, 23, 35, 37.}

Los fármacos antimicóticos sistémicos se recomienda su uso como terapia adyuvante en casos de gravedad, en las que ya hay una reacción de la cámara anterior. No obstante hay estudios clínicos controlados que muestren su eficacia en el tratamiento de la queratitis fungica^{16.}

El efecto clínico de un agente antifúngico se debe en gran parte a la concentración del tejido ocular objetivo. Esto a su vez depende de una serie de factores incluyendo el peso molecular y la concentración del fármaco, la ruta por la que ha sido administrado, el tiempo del contacto del fármaco con el tejido ocular además del tiempo que demore penetrar en el ojo. Los pesos moleculares

de los fármacos como: como la anfotericina B (924,10 Da), ketoconazol (531,44 Da) y natamicina (665,75 Da) o sólo pueden penetrar en un epitelio corneal intacto ya que la disminución de fuerza de fricción aumenta difusión ^{35, 36}. Sin embargo Fluconazol antifúngico posee 2 anillos que contienen 3 átomos de nitrógeno. El anillo bencénico presenta 2 flúor. Su peso molecular es apropiado, 306,3 Da lo que lo hace un gran candidato terapéutico. a continuación, teniendo en cuenta esta información y dependiendo de la condición de la córnea del paciente, es la individualización para evitar el fracaso del tratamiento.

Durante varias décadas los antimicóticos más usados han sido la anfoterina B, fuconazol, miconazol y natamicina, pero no se ha evaluado su eficacia ni su actividad antifúngica, es más, para el tratamiento de queratitis su penetración en la córnea es escasa después de administrarla de manera tópica, debido a esto se tiene grandes limitaciones cuando se requiere hacer estudios clínicos.^{35, 38}.

A continuación, los principales medicamentos citados

POLIENOS

Continúan siendo uno de los fármacos antifúngicos importantes. Su mecanismo de acción está ligada directamente al precursor biológico ergosterol, un esterol que encontramos principalmente en las membranas citoplásmicas de los hongos. La pared de estas membranas se altera, lo que provoca una fuga de componentes intracelulares esenciales para ellas.³⁵

El tamaño del daño ocasionado a las membranas de los hongos es dependiente o directamente a la cantidad de dosis, no obstante, no debe aumentarse la dosis del fármaco que también se puede afectar la membrana de las células del hospedero, y puede ocurrir una toxicidad debido a polienos. La natamicina también conocida como pimaricina y el antimicótico anfotericina B son polienos de uso corriente en el tratamiento de la queratitis fúngica oftálmica.

Anfotericina B

Es considerado antimicótico, fungisida o fungistático dependiendo de la dosis. Su mecanismo de acción es unirse al ergosterol de las membranas plasmáticas de los hongos y causar desorden en la pared micótica que termina por romperla y desintegrarse ^{35, 39}.

Cuando ocurre una infección sistémica causada por hongos como por ejemplo Cándida, Aspergillus, Fusarium se usa como elección primaria la Anfoterina B que se puede administrar por vía intravenosa o tópica.

Las cremas o gel que contiene anfotericina B (0,1 a 0,3%) es el tratamiento de elección común para infecciones oculares debido a la contaminación por el hongo Cándida, mientras que la contaminación por hongos del tipo filamentosos como fusarium se trata principalmente con natamicina al 5%.^{25, 35, 36}.

Para la administración de la anfoterina b se debe combinar con dextrosa y no con solución salina ya que este antifúngico con solución salina precipita impidiendo así su administración. La dosis mínima que se puede usar para que tenga efecto el fármaco es de 1 mg / kg / día, la dosis se debe aumentar de manera gradual dependiendo del paciente y de la infección.

La reacción adversa al administrar el fármaco que se puede presentar en los pacientes generalmente son: toxicidad renal, cefalea, fiebre, síntomas gastrointestinales, algunos de los efectos secundarios pueden ser anemia, vómitos y calambres. ^{35, 39}.

Las queratitis micóticas se pueden tratar con concentraciones tópicas de 0.15 % ya que a esta concentración penetra bien el estroma en un lapso no menor a 30 ni mayor a 60 minutos. el principal problema que se presenta en los pacientes es la toxicidad corneal que se puede presentar ^{35, 36, 39}.

Otros modos de administración:

La inyección en el ojo llamada Intravítrea, sirve para administrar anfotericina B (en cantidades de 1 a 5 mg) en el glóbulo ocular para tratar la queratitis micóticas, estas han sido recomendados para el tratamiento de endoflamitis de origen fúngico, pero de esta manera el suministro puede ser altamente destructiva que conduce a necrosis y desprendimiento de retina. La administración intracameral

en una concentración (7,5 a 10 mg en 0,1 mL) ha sido útil para tratar la queratitis intraoculares³⁹. La eficiencia de estas técnicas de administración son difíciles de evaluar debido a la falta de estudios clínicos controlados con evidencia ³⁵.

Morand et al, realizaron una preparación a base oftálmica liposomal de anfotericina B, que tenía una buena estabilidad incluso cuando se almacena a temperatura ambiente, lo que facilita su uso y así demostraron su beneficio³⁹. Ya se ha reducido la inyección intravítrea de toxicidad ocular en conejos y monos, y el mismo efectos espera que los estudios en seres humanos esto es debido a la colocación de la droga dentro de la bicapa de fosfolípido con el que el contacto con las células epiteliales es limitado, lo que reduce el daño generado Mima. Por lo tanto, una combinación de toxicidad reducida, aumento de la duración en el lugar y se obtiene una mayor concentración de anfotericina B, por el que el índice terapéutico para el tratamiento de hongos queratitis aumentan de manera significativa, aunque el medio no es que son estudios apoyan el uso de esta combinación y no hay ensayos clínicos disponibles en ese momento. ⁴⁰

Natamicina

Actualmente el único fármaco antimicótico tópico y oftálmico indicado para queratitis, es la natamicina aprobado por la FDA y es el fármaco de elección para el tratamiento de queratitis micótica filamentosa, sin embargo, estos fármacos no penetran de manera eficaz el estroma corneal. ^{16, 35-37, 41}

Se ha observado que tienen un amplio espectro para el tratamiento de hongos, como por ejemplo: Acremonium, Aspergillus, Acremonium, Penicillium, Lasiodiplodia, Candida y Fusarium. ^{35, 38}

La natamicina es poco soluble en agua y viene solo para la administración tópica en una suspensión de 5 %. Administración inicial es de una gota cada una a dos horas, se adhieren bien a la superficie de la córnea y es bien tolerado ³⁸.

Sólo alrededor del 2% del fármaco es biodisponible cuando se aplica tópicamente, lo que complica el uso de natamicina por el hecho de que se sienta en la córnea después de la instilación y se descompone fácilmente, reduciendo su efecto.

AZOLES

Su mecanismo de acción es interferir con la síntesis de ergosterol al inhibir la alfa-metilasa, que es una enzima vinculada al citocromo P-450, que convierte lanosterol en ergosterol. Esta inhibición causa la alteración de la membrana y su permeabilidad y afecta las funciones enzimáticas de la membrana fungica ^{35, 36}.

En este grupo hay dos clases: triazoles y imidazoles que comparten el mecanismo de acción y espectro.

Ketoconazol

Es uno de los primeros fármacos azoles con capacidad de ser absorbido por vía oral, cuenta con actividad contra *Fusarium*, *Candida*, *Aspergillus* y ; actualmente se vende bajo la concentración oral (200 mg) a nivel mundial ³⁵.

Cuando el tratamiento es largo con altas dosis de ketoconazol puede causar impotencia, ginecomastia o alopecia, lo que ocasiona un deterioro en la salud del paciente

La aplicación en forma de crema o gel de ketoconazol al 1% y su forma farmacéutica en suspensión se ha utilizado para el tratamiento de queratitis fúngica. El ketoconazol en suspensión es eficaz en la inhibición del aumento de las infecciones fúngicas; no hay evidencia de toxicidad corneal a pesar que, por el momento, no es utilizado comúnmente como una terapia inicial.

Itraconazol

Es un antifúngico triazólico de amplio espectro, con un grado alto de efectividad contra el hongo *Aspergillus* (filamentosos) y otros más de la misma familia ; su absorción es buena cuando es administrada de forma oral, los efectos secundarios son casi nulos aunque el efecto más común fue una molestia gastrointestinal ³⁷. Los efectos secundarios menos frecuentes observados, incluyendo hipertrigliceridemia, hipocalcemia, edema, disminución de la libido y ginecomastia³⁵.

El principal inconveniente del itraconazol oral usado para el tratamiento de infecciones oculares por hongos, es su escasa penetración en la córnea, tanto para el humor vítreo como para el humor acuoso y comparándolos con ketoconazol y fluconazol ^{35, 36}.

la administración ocular tópica de itraconazol a la concentración del 1% es bien tolerada en los pacientes cuando se utiliza en el tratamiento de queratitis micótica, pero no ha demostrado gran eficacia en las queratitis graves debido probablemente a la poca penetración en la cornea ³⁶.

Kalavathy et al ⁴¹ realizó un estudio de eficacia clínica de una preparación de gotas para los ojos itraconazol al 1% usando como patrón natamicina gotas al 5% en el tratamiento para la queratitis fúngica, realizó este estudio para evaluar una mayor proporción de pacientes tratados con natamicina, los resultados fueron favorables en comparación con los que recibieron itraconazol tópica y concluyen que la natamicina tópica debe considerarse como el tratamiento de adecuado para la queratitis fúngica filamentosa, además la administración tópica de itraconazol se podría usar, en particular si las infecciones responden a *Aspergillus* spp o *Curvularia* spp.

Fluconazol

Pertenece a la familia antifúngica de triazoles, tienen una excelente eficacia en *Candida* y menos eficaces ante hongos filamentosos ¹¹. La formulación tópica más usada es al 0,2% cabe recalcar que posee una penetración ocular mayor que la anfotericina B y la natamicina y una baja toxicidad ocular siendo esto decisivo a la hora de decidir el tratamiento adecuado. Incluso algunos autores la utilizan como tratamiento de primera opción para el tratamiento de la queratitis por *Candida* ^{11, 35}

Exposiciones fluconazol excelentes propiedades farmacocinéticas nivel de los ojos y es clínicamente eficaz en la *Candida*, sin embargo, ha sido menos los efectos de tratamiento primario de natamicina frente a la familia de H. filamentosa ³⁶.

Sonego et al ⁴² relataron una respuesta clínica a la queratitis tópica fluconazol satisfactoria causada por hongos filamentosos, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes tratados con el fluconazol tópico solo y aquellos que recibieron un tratamiento mixto.

Yilmaz y Maden ⁴³ en 2005 realizó una aplicación de subconjuntival eficacia de estudio de fluconazol contra el fallo de la terapia intravenosa y oral del mismo se

evaluó que concluyó que su uso puede ser eficaz en gran medida para tratamiento de la queratitis fúngica grave ulcerosa, siendo muy útil para evitar la intervención quirúrgica en una fase aguda de la infección. Sin embargo, no se pudo determinar la eficacia de las diferentes dosis, (concentración) esto es en parte debido a la muestra insignificante (población) del estudio-acción de fluconazol tópico.

Voriconazol

Es fármaco innovador Triazólico antifúngico derivado del fluconazol, que se caracteriza por su amplio espectro de acción; Se encuentra comercialmente disponible para administración sistémica e intravenosas inclusive por vía oral 45. Tiene un espectro de actividad antifúngica excelente y es activa contra especies que son conocidas por ser resistentes a otros agentes antifúngicos comúnmente utilizados 38, 46.

El voriconazol demostró *in vitro* tienen una mayor actividad que la anfotericina B y el fluconazol contra las cepas de *Candida* (siendo las más sensibles *C. albicans*) e inclusive con cepas de hongos filamentosos que fluconazol no contaba como *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* spp, *Pseudallescheria* sp, *Acremonium* spp y otros los hongos como *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Scedosporium apiospermum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Cryptococcus neoformans* 46, 47, 48.

La administración sistémica mostró buena penetración ocular, siendo las CIM eficaces en el humor vítreo y acuoso, después de dos días de tratamiento con voriconazol vía oral (400 mg / día) 36, 38, 46, 47. La formulación tópica de voriconazol (tópica 3 µg / mL), cuenta con una estabilidad y actividad antifúngica comprobada. Intravítreo voriconazol (50 µg / mL) resultó eficaz contra el origen fúngico endoftalmitis refractaria, y seguro para las estructuras oculares 38.

Se ha notificado el uso reciente de la inyección intra-estromal de salvamento método voriconazol la ausencia de respuesta a la terapia tópica en los casos de úlceras profundas. gran porcentaje de las personas que sufren de anfotericina B e itraconazol, tienen una actividad óptima frente a los hongos que son resistentes a la anfotericina B e itraconazol, la confianza de seguridad requerida. Las inyecciones intra-estromal de voriconazol ayudaron en la resolución rápida y completa de las úlceras fúngicas y concluir que su tópico añadido a la inyección intra-estromal podría ser beneficioso en estos casos, sin embargo, los ensayos clínicos son necesarios para determinar este método como terapia 39.

Según Al-Badriyeh et al demostró éxito clínico con voriconazol tópico del 1%, cuando se utilizó como terapia de primera línea para el tratamiento de queratitis provocada por *C. albicans*, concluyendo que su utilización tópica podría reducir el daño tóxico e interacciones medicamentosas comunes asociados a las terapias antifúngicas. 49

2.2.9 Importancia de los ensayos de toxicidad ocular

La zona en la cual colinda órganos como la vista y la piel es una zona sensible. La exposición a sustancias puede ser accidental como voluntaria por lo cual es importante analizar los efectos que pueden repercutir en estos órganos, por lo cual es muy importante el desempeño del profesional químico farmacéutico en análisis de estas sustancias en su amplia variedad y forma farmacéutica

cabe recordar un caso que ocurrió en la década de 30 en los Estados Unidos simbolizó el punto de partida para la mejora de técnicas que avalen la seguridad de los productos cosméticos. Wilhelm relata que ya en 1933, una mujer americana perdió la vista luego de aplicarse un rímel que contenía como excipiente parafenilendiamina, una sustancia química que puede producir blefaritis alérgica, querato-conjuntivitis crónica y queratitis bacteriana secundaria.

Luego de este incidente se inició un análisis más exhaustivo de la capacidad irritante de los productos de consumo. En 1938 el congreso de los EE.UU. dictamina la ley federal de alimentos medicamentos y cosméticos, bajo esta ley se establece que los fabricantes de estos productos deben realizar análisis de irritación ocular y dérmica antes de entrar en el mercado.

Durante la década del 40 y liderando el departamento de toxicología dérmica y ocular de la Food and Drug Administration (FDA), El Dr. John Draize junto a su equipo desarrollaron un papel determinante en el desarrollo de técnicas para lograr analizar la seguridad de los productos cosméticos. desarrolló una técnica para evaluar la toxicidad de los productos que se administran tópicamente, tanto a nivel dérmico como oftálmico.

La mayoría de laboratorios fueron aceptando las técnicas propuestas por Draize Se incluyo los protocolos. Ya en los años sesenta se hablaba de las técnicas de Draize.

Estas técnicas en la actualidad son aprobadas por la organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE) los países en el mundo en su gran mayoría aprueban el desempeño de estas técnicas para la comercialización de productos cosméticos.

Por consiguiente, la aplicación de sustancias en el ojo o la piel de conejos son los principales métodos utilizados para evaluar los efectos adversos de las sustancias que entran en contacto con el ojo o la piel. Estos ensayos pueden identificarse tanto el daño reversible como irreversible (por ejemplo, la corrosión)

y proporcionar una evaluación cualitativa que da el valor numérico para la clasificación de los compuestos de acuerdo con su efecto irritante.

2.2.10 Anatomía del ojo humano

Cornea: Histológicamente hablando está conformada por cinco capas: epitelio, membrana de Bowman, membrana de descemet, endotelio y por último estroma. Tiene una gran capacidad regenerativa, la luz atraviesa la córnea y llega a la retina, por lo que la pureza de esta lente es vital para el buen funcionamiento del ojo. Uno de los factores que apoyan esta transparencia de la córnea son la poca presencia de vascularización y de pigmentación.

Conjuntiva: es una mucosa que se encuentra alrededor de la esclera la cual está expuesta directamente al ambiente (conjuntiva bulbar) y a su vez a la (conjuntiva palpebral). Se caracteriza por ser altamente vascularizada en contraste con la cornea posee terminaciones nerviosas y glándulas conjuntivales y células inflamatorias.

Iris: principal componente de la túnica vascular. Lo podemos localizar inmóvil entre la córnea y la lente y sus extremos se insertan en los procesos ciliares está conformado por fibras circulares y radiales de músculo liso cuya principal función es la regulación de la luz gracias al movimiento de la pupila. El sistema nervioso autónomo es responsable de la regulación del diámetro pupilar en respuesta a cambios en la intensidad de la luz, siendo el sistema autónomo el responsable de la apertura y cierre del diámetro de la pupila en respuesta de los cambios en la intensidad de la luz.

Globo ocular: sus principales partes externas son los párpados, las cejas, pestañas y músculos extrínsecos del ojo y el aparato lacrimal.

La función del párpado es cubrir y lubricar el ojo durante el sueño además de la luz intensa y algunos cuerpos extraños cabe mencionar su función secretora de lubricantes.

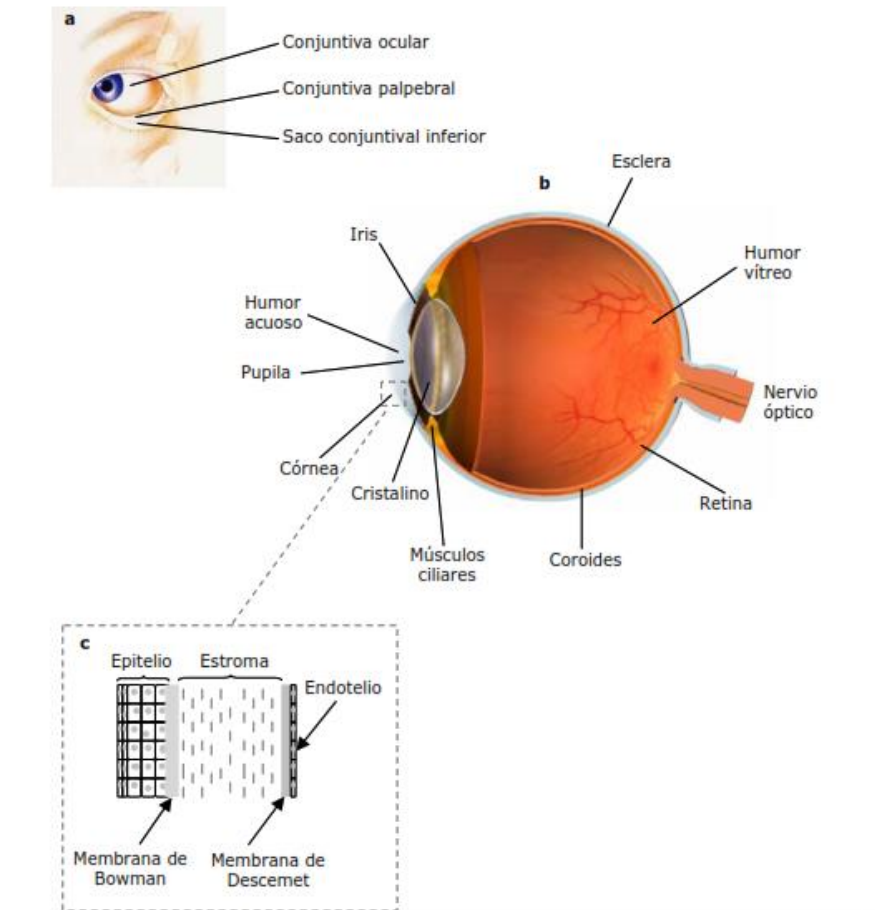
Pestañas: emergen de los bordes en cada parpado, a su vez las cejas en forma de arco que atraviesa de manera transversal el parpado superior. Entre sus principales funciones proteger del sudor y la luz destellante.

Seis músculos extraoculares: son aquellos músculos que se encargan del movimiento del globo ocular, están inervados por los nervios craneales III IV y VI.

El ojo se mueve de manera rápida uniforme y precisa porque las células motoras son pequeñas las neuronas solo inervan entre dos o tres fibras musculares.

Aparato lacrimal: tenemos una cantidad que varía entre seis a doce canales lacrimales que hacen posible la segregación de un líquido acuoso, posee forma de almendra, las lágrimas a su vez contienen una sustancia química llamada lisozimas que posee una actividad antimicrobiana que limpian preservan y lubrican y su vez hidratan el globo ocular, cada glándula produce un aproximado de 1ml de la solución diariamente.

FIGURA 6: ANATOMIA DEL OJO.



Cuadro de la anatomía del ojo. De arriba abajo (a) se muestra la localización de la conjuntiva que recubre la parte externa del globo ocular y la cara interna de los párpados. También se muestran todas las estructuras que forman el globo ocular (b) y la organización histológica de la córnea (c).

Martínez (2007) "Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos *in vivo* aplicado al estudio de tensioactivos del tipo lipoaminoácido [tesis pre grado]. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2445/41761>

Tanto la eliminación como la segregación de lágrimas se da de manera simultánea. Una cantidad se evapora y otra atraviesa los canales lagrimales dirigiéndose a los canales nasales, sin embargo, cuando el ojo se encuentra frente a un proceso irritativo la producción de glándulas lagrimales aumenta, la finalidad que las lágrimas arrastre la sustancia que provoca irritación.

2.2.11 Draize prueba de irritación en los ojos

La prueba de irritación ocular *in vivo* evalúa los efectos adversos de las sustancias en la córnea, el iris y la conjuntiva. A partir de la córnea, se evalúan la opacidad y el área afectada; el iris, la presencia de inflamación, dobleces, edema, inyección ciliar circindreana, fotofobia, hemorragia y destrucción del tejido; y de la conjuntiva, el grado de enrojecimiento, huesos y la presencia de exudados. En el método de análisis desarrollado por Draize y sus colaboradores (1944), determina los cambios ocasionados por la sustancia irritante tienen una severidad diferente, dependiendo del área afectada. Los daños a la córnea son más importantes cuando se clasifica una sustancia como irritante o corrosiva.

TABLA 2: CLASIFICACIÓN DE DRAIZE

Iris	
A. Valoración	
Normal.....	0
Pliegues notablemente hundidos, congestión, inflamación, moderada hiperemia o inyección circuncorneal; iris reactivo a la luz (si la reacción es defectuosa se considera como efecto).....	1
Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz.....	2
<i>Cálculo del valor total = A x 5; Valor total máximo = 10</i>	
Conjuntiva	
A. Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar; se excluye la córnea y el iris)	
Normal.....	0
Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyectados).....	1
Coloración carmesí difusa; no se distinguen fácilmente los vasos individuales.....	2
Coloración carne difusa.....	3
B. Quemosis	
Normal.....	0
Cierta hinchazón superior a lo normal (incluyendo la membrana nictitante).....	1
Hinchazón evidente con eversión parcial de los párpados.....	2
Hinchazón con párpados medio cerrados.....	3
Hinchazón con párpados más que medio cerrados.....	4
C. Lagrimeo	
Sin lagrimeo.....	0
Cierta cantidad de lágrima por encima de lo normal (sin incluir la pequeña cantidad que queda en el cantus interior de los ojos no tratados).....	1
Lagrimeo que humedece los párpados y el pelo adyacente.....	2
Lagrimeo que humedece los párpados y una región considerable alrededor de los ojos.....	3
<i>Cálculo del valor total = (A + B + C) x 2; Valor total máximo = 20</i>	

Tabla de valoraciones descrita por Draize que permite convertir las observaciones subjetivas individuales de los tres tejidos oculares en un único valor numérico para estimar la lesión ocular total (Draize y cols., 1945).

2.2.12 Limitaciones y críticas al ensayo de Draize ocular.

Durante muchos años los ensayos literarios han sufrido un análisis exhaustivo. Mucho se ha cuestionado la forma en la que se realiza la prueba. Ya sea su importancia y/o su reproducibilidad. La manera cómo se valora las interpretaciones de los datos proporcionados por esta técnica. El gran costo económico y la ética profesional. También se critica que esta técnica ha sufrido muchas variaciones en los últimos 50 años lo cual de nota que todavía no se encuentra perfeccionada y que todavía tiene muchos aspectos por resolver, entre ellos se encuentran los siguientes: ¹¹

1. Según indica Goldberg los datos proporcionados por la técnica de Draize son un componente más a la hora de entender el universo del perfil toxicológico de una sustancia. Las técnicas actuales no sólo se basan en valores sino en pruebas clínicas. Técnicas *in vitro* y en técnicas en animales. Modelos asistidos por computadora y la experiencia en humanos. ¹¹
2. Según lo que manifiesta Schalatter se critica que los ensayos de Draize tienen cómo única función analizar las sustancias que por su naturaleza entran en contacto con el ojo o la piel. cómo los productos cosméticos y oftálmicos. Por lo tanto, cuándo de manera accidental otro producto que no está destinado para este uso entra en contacto con el ojo o la piel la utilización del técnico de Draize no sería adecuada ya que la instilación de una cantidad fija de producto no se ajusta a las condiciones de una exposición accidental. En estas circunstancias, el propósito de las pruebas toxicológicas es suministrar información indispensable para el manejo y el rotulado adecuado del producto. ¹¹

3. Según Wilhelmus los valores proporcionados por la técnica del Draize valoran los daños visibles y los valores en la escala de draize. Más no son tomadas en cuenta aspectos como el daño a nivel microscópico y/o *invitro* ni niveles moleculares. ¹¹
4. Según York la estandarización y reproductibilidad de esta prueba está delimitada por las numerosas variables que interceden en la evaluación. Concurren otras causas de diversificación en los datos del ensayo: el tipo de animal, la tasa de liberación de un producto respecto a su vehículo, la cantidad de lagrimeo, la zona del ojo donde se instila la sustancia, la facilidad con la que se puede valorar la gravedad de las lesiones y la subjetividad del analista. Conjuntamente, modelos de la misma cepa en ocasiones responden de forma diferente a la misma sustancia y diferentes analistas logran obtener conclusiones distintas del mismo. ¹¹
5. Existe diferencias notables entre los ojos humanos y los ojos del conejo como por ejemplo la presencia de un tercer parpado en el ojo del conejo además de la eliminación del fármaco es más rápido en los animales debido a este tercer parpado, aún falta documentar bien estos estudios con estudios comparativos (Curren y Harbell, 1998). ¹¹
6. La córnea del conejo es diferente en el grosor que es aproximadamente de 0,37 mm mientras que en la córnea humana es de 0,51 mm (Calabrese, 1983). La secreción lacrimal de los conejos es menor al del ser humano. Por último, los conejos jóvenes tienen la capacidad de regenerar el endotelio corneal dañado, mientras que el ser humano no tiene esta capacidad. ¹¹

2.2.13 HET CAM

La membrana Corioalantoidea (CAM)

Estructura muy vascularizada, utilizada por intercambio gaseoso a través de la cáscara del huevo de gallina es una el embrión de pollo para el del huevo. Sus características estructurales la hacen similar a tejidos altamente vascularizados como la conjuntiva y su respuesta es eficaz ante productos irritantes.

HET-CAM

La finalidad de ensayo es la valoración del efecto irritante de las sustancias químicas con la utilización de la membrana Corioalantoidea en esta técnica podemos observar los cambios que suceden en la membrana cómo son las hemorragias la vasoconstricción y la coagulación es importante recalcar el uso de huevos fértiles incubados menores a 10 días ya que posterior a los 10 días el embrión desarrollo el sistema nervioso que lo hace proclive a sentir dolor.

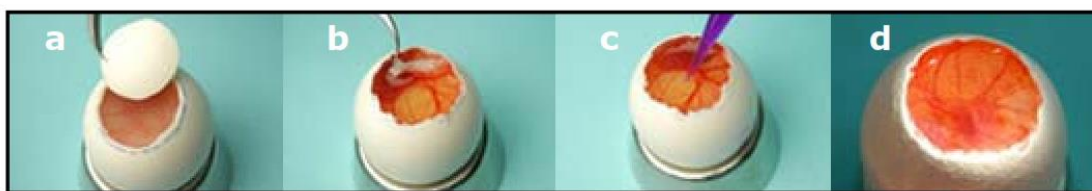
La concentración de las sustancias a utilizar en el método de HET-CAM generalmente son menores al 5%.

Protocolo experimental

Se basa en el protocolo INVITTOX núm. 96 descrito a partir de los trabajos de Luepke (1985).

- La técnica consiste en utilizar la CAM un modelo que simule un ojo humano para poder en ella utilizar y medir el grado de toxicidad de las sustancias químicas empleadas en la industria para este fin es necesario huevos fértiles con una incubación máxima de 10 días , es necesario aperturar el huevo y exponerla ambiente la membrana Corioalantoidea, para esto se ubica la zona la ancha del huevo donde se encuentra la cámara de aire, es importante la pericia del analista a la hora de aperturar los huevos , antes de la cam encontraremos la membrana blanquecina esta se deberá retirar humedeciéndola con ayuda de suero fisiológico por un lapso de 5 minutos luego de retirar esta nos encontraremos con la CAM una membrana altamente irrigada y vascularizada.

FIGURA 7: PREPARACION DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA.



En la imagen superior se muestra la preparación de la membrana, primero se recorta la cáscara del huevo (a) y se elimina una primera membrana blanquecina (b) para exponer la CAM. A continuación, se aplican los productos (c) y se valoran los fenómenos de forma visual (d)

Martínez (2007) "Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo aplicado al estudio de tensioactivos del tipo lipoaminoácido [tesis pre grado]. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2445/41761>

- Exposición de la membrana Corioalantoidea a productos tensioactivos. Se prepararon las soluciones 0 al 2 % (p/v) en solución salina fisiológica y se aplicaron 0,3 mL de la solución a la membrana Corioalantoidea por 20 segundos. Luego se lavó con agua destilada y se realizó la observación de la membrana para ver la aparición de hemorragias, vasoconstricción y coagulación. Se anotaron en una ficha durante el periodo de 5 minutos
- Para poder calcular el índice de irritación ocular es necesario utilizar la siguiente fórmula en la cual se valora los tiempos de aparición de los distintos fenómenos como la hemorragia la coagulación y la vasoconstricción:

$$IIO = \frac{(301-h) \times 5}{300} + \frac{(301-v) \times 7}{300} + \frac{(301-c) \times 9}{300} ,$$

Las letras h, v y c corresponden a los tiempos de aparición de hemorragia y se expresa en segundos, lo mismo para los parámetros de vasoconstricción y coagulación, respectivamente., los tensioactivos se clasifican según la Tabla 3.

TABLA 3: CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS IRRITANTES HET-CAM.

IIO	Clasificación
De 0 a 0,9	No irritante
De 1 a 4,9	Ligeramente irritante
De 5 a 8,9	Irritante
De 9 a 21	Muy irritante

Según el índice de irritación ocular por el método HET-CAM.

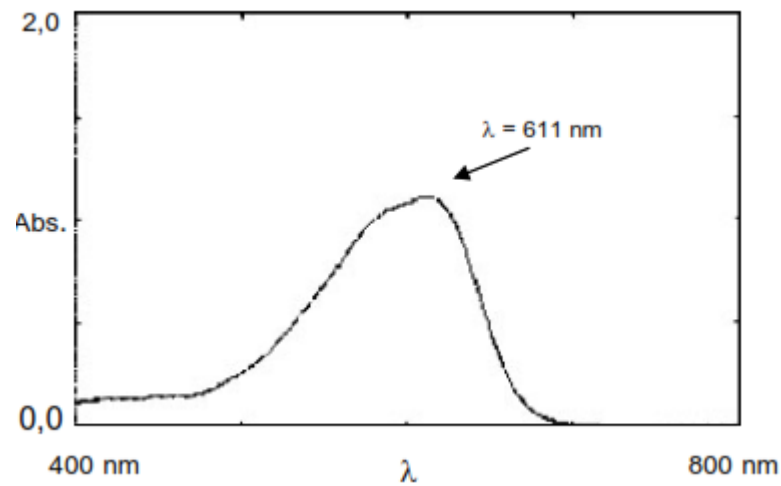
Modificación del HET-CAM: CAM-TBS

El método HET-CAM presenta el inconveniente que está sujeto a la valoración subjetiva del observador por lo tanto no es confiable ni reproducible este método a escala . Para evitar esto, se desarrolló una modificación almetodo llamado CAM- TBS, , en este caso, lo que se valora es la capacidad del colorante azul de tripán de penetrar a través de las membranas lesionadas. Esta modificación determina la cantidad de colorante que absorbe la membrana, por tanto, a diferencia del HET-CAM, es un método cuantitativo.

- Protocolo experimental del método CAM - TBS. Después de que se expuso la membrana corioalantoidea a la sustancia tensioactiva se depositaron 0,5 mL de la solución de azul de tripan (0,1 % en PBS) por un tiempo de 1 minuto. Luego se lava y se coloca en una cápsula de Petri con agua destilada y así eliminar el exceso de colorante que no se ha absorbido. Para determinar la cantidad de colorante absorbida por la membrana corioalantoidea se pesa y se introdujo en un tubo de material de poliestireno y se agrega 3 mililitros de formamida que es un solvente que extrae el colorante que es absorbido o fijado por la membrana.

Cuando la formamida extrae todo el colorante fijado se retira la membrana y de la solución se mide la absorbancia. se analizó el espectro de absorbancia de la solución de azul de tripán (Figura 8) para establecer el pico máximo de absorbancia que está entre los 580 y los 620 nm.

FIGURA 8: ESPECTRO DE ABSORBANCIA DEL COLORANTE AZUL DE TRIPÁN

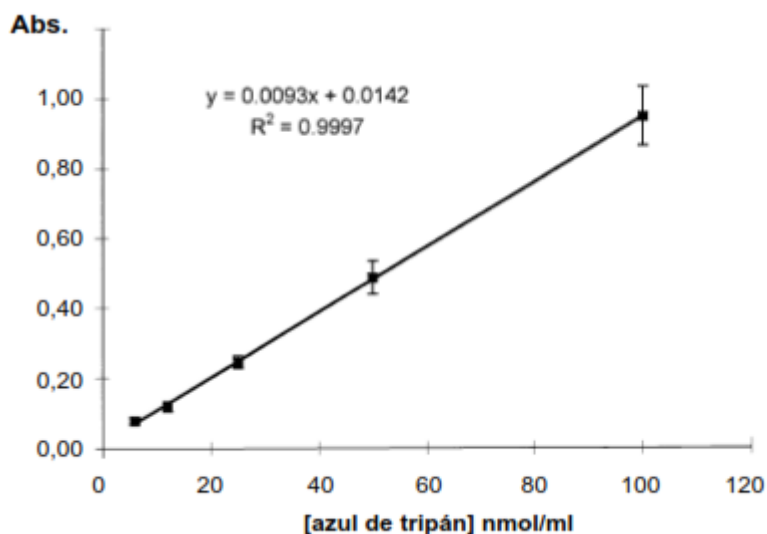


En este caso el pico máximo de absorbancia se encuentra a 611 nm.

Martínez (2007) "Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo aplicado al estudio de tensioactivos del tipo lipoaminoácido [tesis pre grado]. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2445/41761>

La concentración final de colorante de las muestras se calculó a partir de una recta patrón calculada a partir de cantidades conocidas del colorante. Los resultados se expresaron en nanomoles del colorante adsorbido por mg de tejido. El hecho de expresar la cantidad de colorante en función del peso del tejido reduce la variabilidad de los resultados ya que no es necesario cortar siempre la misma cantidad de membrana, una maniobra bastante delicada (Vinardell y García, 2000).

FIGURA 9: ECUACIÓN DE LA RECTA DE ABSORBANCIAS DE AZUL DE TRIPÁN.



Martínez (2007) "Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo aplicado al estudio de tensioactivos del tipo lipoaminoácido [tesis pre grado]. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2445/41761>

En función de la cantidad de colorante adsorbido a la membrana, los compuestos pueden clasificarse según se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4: CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS IRRITANTES HET TBS

Colorante adsorbido (nmoles/mg)	Clasificación
<0,100	No irritante
0,100-0,150	Irritante
>0,150	Muy irritante

Clasificación de las sustancias irritantes en función de la cantidad de azul de tripán absorbido en la membrana.

2.3 Hipótesis:

2.3.1 Hipótesis general.

La toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol analizadas por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de emergencias Villa El Salvadores Baja.

2.3.2 Hipótesis específicas.

1. ¿Existen valores: temperatura, humedad, densidad de los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*) Según el protocolo HET-CAM?
2. ¿Existen toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador?
3. ¿Existen concentraciones tóxicas de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina?

2.4 Variables.

2.4.1 Tabla de operacionalización de variables.

DIMENSIONES DE VARIABLE		
VARIABLES DEPENDIENTE	<ul style="list-style-type: none">• Nivel de toxicidad ocular aguda	TOXICOLOGIA
VARIABLE INDEPENDIENTE	<ul style="list-style-type: none">• Colirios elaborados a base de fluconazol a 2mg /mL• Colirios elaborados a base de fluconazol a 4mg/mL• Colirios elaborados a base de fluconazol a 6mg /mL• Colirios elaborados a base de fluconazol a 8mg /mL	FARMACIA MAGISTRAL

2.5 Marco conceptual²⁷

1. **Embrión:** Es el inicio del crecimiento y desarrollo de un ser vivo cuando está ubicado en el huevo o útero de la madre.
2. **Colirio:** Es un medicamento líquido que permite su aplicación en el ojo en gotas dosificadas.
3. **Lisis vascular (het cam):** Desintegración de los vasos sanguíneos.
4. **Hemorragia (het cam):** Sangrado de los vasos.
5. **Coagulación (het cam):** Desnaturalización de proteínas intravasculares y extravasculares.
6. **Incubación:** Puede referirse a la acción de calentar los huevos llevada a cabo por los animales ovíparos para que sus crías se desarrollen y nazcan
7. **Concentración:** Se refiere a la cantidad de soluto que se disuelve en un disolvente, esta proporción no cambiara a menos que se agregue más soluto o más solvente
8. **Prueba Draize:** Es una prueba para evaluar la toxicidad la irritación que causa en las zonas cutánea u ocular
9. **Membrana Corioalantoidea:** Es una membrana presenta generalmente en aves y reptiles está muy vascularizada y se forma por la unión del corion y el alantoides
10. **Queratitis:** Es una inflamación de la córnea que puede llegar a comprometer la visión.

- 11. *Úlcera*:** Es una lesión en forma de cráter, rotura de la piel o inflamación. Las úlceras pueden tener origen y localización muy variada. En general pueden estar acompañada de una infección y asumen formas de varios tipos.
- 12. *Irritación*:** Es una inflamación de la piel que puede presentar enrojecimiento o picazón debido al contacto de una sustancia extraña
- 13. *Cámara de aire del huevo*:** Es el espacio vacío entre la clara que está cubierta por membrana y la cascara del huevo, el tamaño de la cámara de aire nos indica la frescura del huevo.
- 14. *Humedad relativa media*:** Es la cantidad de agua que se encuentra en el aire en forma de vapor, comparando este con el valor máximo de agua que puede contener el aire
- 15. *Aguda*:** Es un término que define "tiempo de evolución" de alguna enfermedad.
- 16. *Huevo de gallina fértil*:** Es producido por un plantel reproductor, donde conviven los machos con las hembras, y por lo tanto ese huevo ha sido fertilizado, en lugar de presentar un blastodisco, presenta un blastodermo, o sea contiene un embrión antes de haber sido puesto
- 17. *Blastodermo*:** Es una membrana de origen primario o primitiva que se presenta en animales inferiores esta está formando la pared de la blástula, en os mamíferos forma parte del blastocito.

CAPÍTULO III. MÉTODO.

3.1 Tipo de estudio.

Observacional

Porque mediante el estudio logramos recopilar los datos de irritación a partir de la observación como punto de inicio dando a conocer los niveles de toxicidad ocular aguda de los colirios mediante la observación directa la membrana Corioalantoidea (CAM) elaborados en el hospital de emergencias de Villa El Salvador (HEVES) – Villa el Salvador.

3.2 Diseño a utilizar.

Experimental

La investigación experimental consiste en utilizar el método científico en conjunto con una serie de experimentos tanto dentro como fuera de un laboratorio. Se desea comprobar los efectos de una intervención específica del investigador.

3.3 Población.

Colirios elaborados a base de fluconazol

3.4 Muestra.

4 colirios elaborados a base de fluconazol:

- 01 colirio elaborados a 2mg /mL de fluconazol.
- 01 colirio elaborados a 4mg /mL de fluconazol.
- 01 colirio elaborados a 6mg /mL de fluconazol.
- 01 colirio elaborados a 8mg /mL de fluconazol.

3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La recolección de datos se desarrolló mediante formatos que describen los informes técnicos obtenidos mediante el análisis experimental.

Equipos

- ✓ Ovoscopio. s/marca
- ✓ Incubadora. s/marca
- ✓ Balanzas analíticas Radwag
- ✓ Macroscopio
- ✓ Cronómetros.

Insumos

- ✓ Hidróxido de sodio.
- ✓ Lauril sulfato de sodio.
- ✓ Cloruro de sodio
- ✓ Agua destilada.

Materiales

- ✓ Fiolas 100mL.
- ✓ Mortero y pilón.
- ✓ Pipetas.
- ✓ Pinzas quirúrgicas.
- ✓ Tijeras quirúrgicas.
- ✓ Soporte para huevos.
- ✓ Rotuladores.
- ✓ Lunas de reloj.
- ✓ Vaso Beaker.
- ✓ Baguetas.

1. ELABORACIÓN DE LA INCUBADORA

La incubadora se elaboró a base bloques de madera tornillo de dimensiones: 1.50m de largo, 80 cm de ancho una altura de 30 cm.

FIGURA 10: ELABORACION DE INCUBADORA



Se le agrego placas de Tecnopor en todo el interior con la finalidad de preservar el ecosistema creado en el sistema, posteriormente se le agrego:

- ✓ sensores de humedad
- ✓ sensor de temperatura ambiente
- ✓ el sistema de ventilación
- ✓ el sistema de volteo automático.
- ✓ Se agregó 2 las fuentes de calor de 25Watts

y finalmente se le hizo 6 agujeros de diferentes tamaños con la finalidad de generar viento por la diferencia de temperaturas (el intercambio de aire sistema), todos estos requisitos indispensables.

FIGURA 11: INTERCAMBIO DE AIRE DE LA INCUBADORA



2. RECOLECCION Y SELECCIÓN DE LOS HUEVOS FERTILES

Los 120 huevos fértiles fueron proporcionados por a Doña Diana dueña de la una avícola en Villa el Salvador, luego de la recolección se empezó a separar los huevos fértiles en base al protocolo de invittox 96 siendo estos: peso, tamaño, forma del huevo, tiempo de haber sido procreado, raza de los padres etc. Luego se hizo la prueba de densidad en el agua para determinar el daño interno de los huevos, obteniendo de este control de calidad un total de 90 huevos óptimos para la incubación.

FIGURA 12: PRUEBA DE DENSIDAD POSITIVA.



Se observa en la imagen el huevo fértil con densidad optima (cámara de aire optima)

FIGURA 13: PRUEBA DE DENSIDAD CONTAMINADA



Se observa en la imagen huevos que no pasaron la prueba de densidad. Cámara de aire contaminada.

3. ELABORACION DEL OVOSCOPIO:

Para fabricar el ovoscopio se usó un cilindro de plástico PVC el cual fue internamente forrado con papel aluminio acoplándolo a un foco led de 95watts de luz blanca potente con sócalo en la base, finalmente en la parte superior del cilindro una tapa de PVC con un orificio de un tamaño proporcional al tamaño del huevo.

FIGURA 14: ELABORACION DE OVOSCOPIO



4. INCUBACION DE LOS HUEVOS FERTILES SELECCIONADOS

Para la incubación se preparó la incubadora con los estándares detallados en el protocolo de invittox 96 luego se procedió a depositar los huevos en sus respectivos lugares.

FIGURA 15: HUEVOS FERTIL EN INCUBADORA



En la figura nos encontramos preparando la incubadora para posteriormente depositar los huevos que pasaron todos los criterios de exclusión dentro la incubadora.

FIGURA 16: DIA 1 DE INCUBACION.



De inicia la incubación exitosamente con todos los indicadores óptimos (temperatura humedad relativa estables y constantes)

5. VOLTEO AUTOMATICO, TEMPERATURA Y HUMEDAD.

A partir del 3 día se dispuso a hacer el volteo con la finalidad de fortalecer el embrión luego se procedió a programar el volteo automático cada 4 horas la temperatura adecuada para el desarrollo embrionario es 37.8 C° y la humedad relativa en el rango de 55 a 65 estos se deben mantener hasta el noveno día.

FIGURA 17: SENSOR DE TEMPERATURA DIGITAL



FIGURA 18: SISTEMA DE VENTILACION Y VOLTEO AUTOMATICO

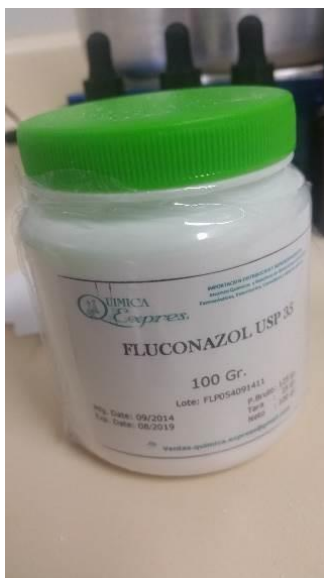


ELABORACIÓN DE COLIRIOS DE FLUCONAZOL

ELABORACION DE LOS COLIRIOS

La formulación magistral es una facultad exclusiva los Químicos Farmacéuticos, a diferencia de otras facultades que compartimos con los demás profesionales la salud como lo son la farmacoterapia y la farmacovigilancia. Esto hace a la farmacotecnia una actividad estratégica dentro de los Servicios de Farmacia capaz de brindar una medicación personalizada a la exigencia de cada paciente. Para elaboración de los colirios de Fluconazol usamos las instalaciones de Farmacia Magistral del Hospital de Emergencias de Villa el Salvador en el año 2018.

FIGURA 19: FLUCONAZOL USP



Empleamos 100mg de Fluconazol USP 35 (Químicamente Puro) comprado en la droguería Química Express S.A.C.

FIGURA 20: TOMA DE MUESTRA (PRUEBA DE SOLUBILIDAD)



FIGURA 21: PESADO SOLUTO (PRUEBA DE SOLUBILIDAD)

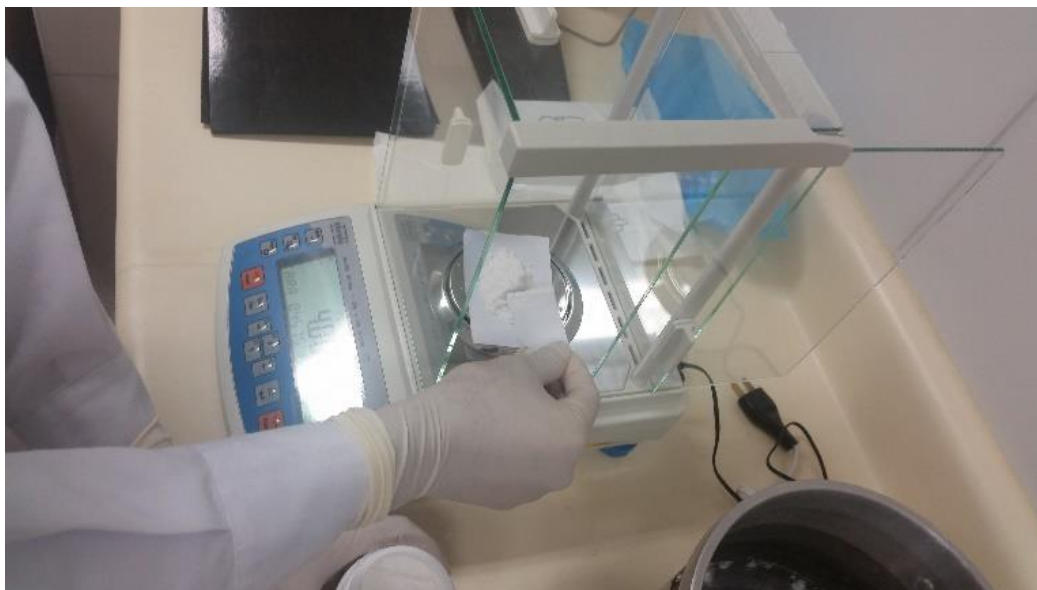


FIGURA 22: SOLVENTE (PRUEBA DE SOLUBILIDAD)



Después se procedió a ejecutar la prueba de solubilidad para eso depositamos un 1g de fluconazol USP 35 en un Beaker de 20mL y completamos con agua para jeringas dándonos como resultado que fluconazol USP 35 es muy soluble en agua.

FIGURA 23: MEZCLADO Y HOMOGENIZADO (PRUEBA DE SOLUBILIDAD)

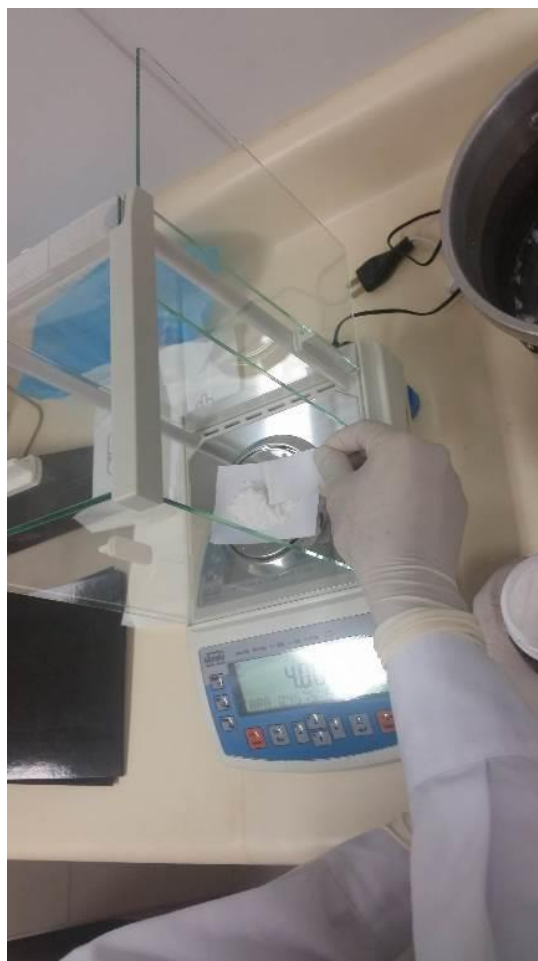


FIGURA 24: SOLUBLE EN AGUA (PRUEBA DE SOLUBILIDAD)



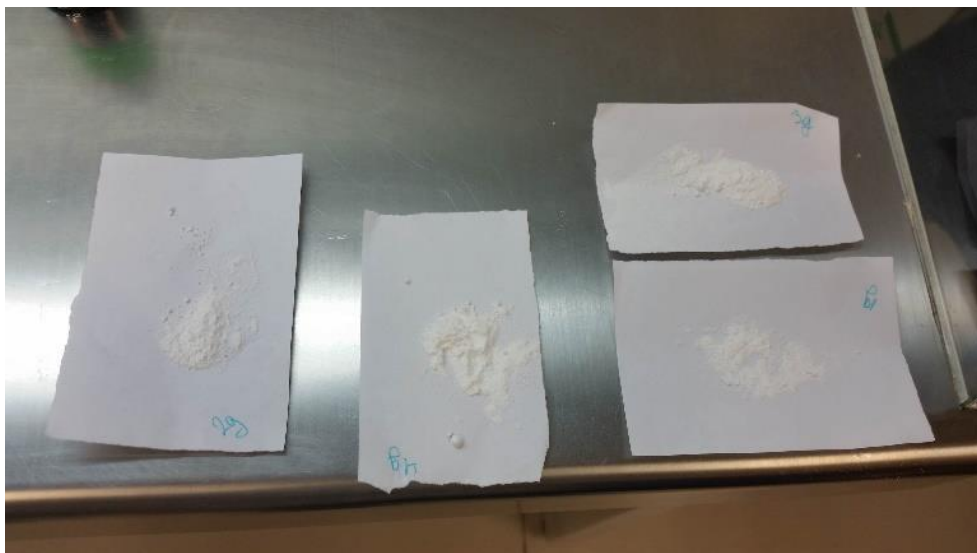
En la imagen se aprecia la solubilidad del Fluconazol en agua para jeringas, Se Agregó Temperatura Media Para Una Correcta Homogenización se aprecia la solubilidad del Fluconazol en agua para jeringas.

FIGURA 25: PESADO DE SOLUTO (HET CAM - COLIRIOS)



Procedemos a pesar el soluto de nuestros colirios de 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL y 8mg/mL respectivamente y lo vertimos en un vaso Beaker de 50mL,

FIGURA 26: SOLUTOS (HET CAM - COLIRIOS)



En la imagen se aprecia los 4 solutos de nuestros futuros colirios ya pesados y siendo esterilizados por la luz ultravioleta del equipo

FIGURA 27: FRASCOS AMBAR (HET CAM - COLIRIOS)



Frascos tipo gotero de vidrio ámbar capacidad 30mL

A continuación, procedemos a desinfectar los goteros ámbar de nuestros futuros colirios con alcohol 98° dejamos secar en la campana de flujo laminar.

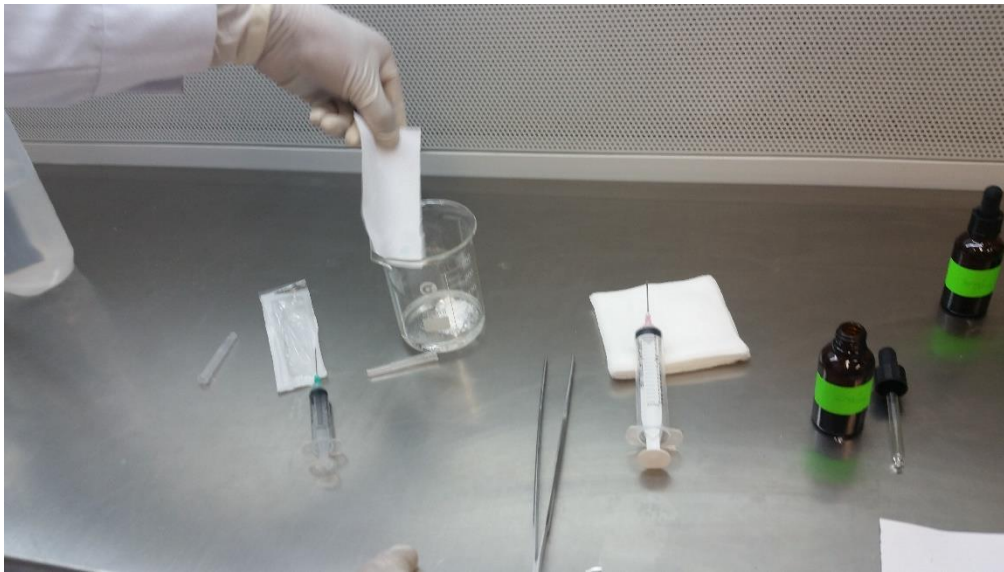
FIGURA 28: CAMARA DE FLUJO LAMINAR



Procedemos a esterilizar nuestro equipo de trabajo

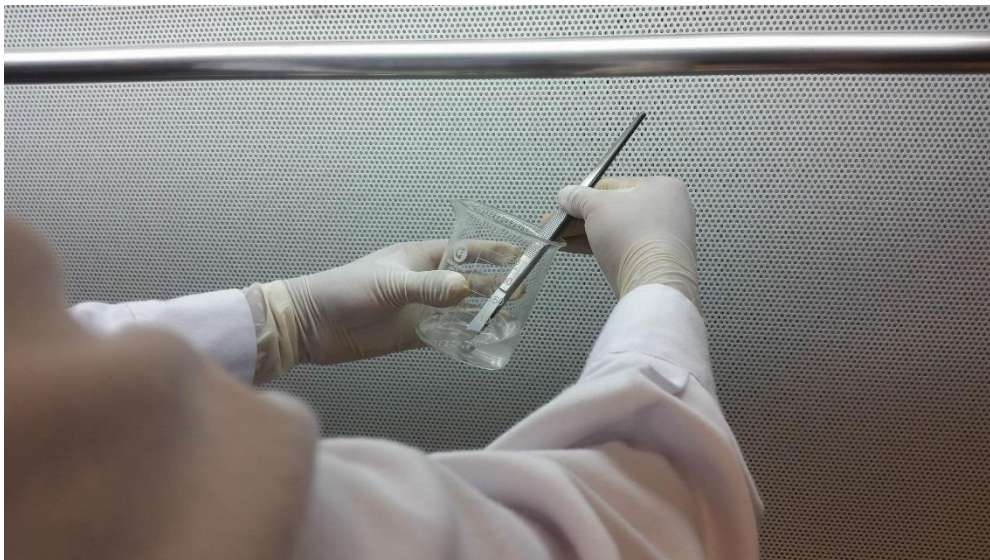
Nuestros solutos junto con nuestros demás insumos son dirigidos hacia la campana de flujo laminar y encendemos la luz Ultra violeta del equipo por 5 minutos para asegurar la esterilidad de los futuros colirios, luego procedemos a encender la extracción de aire de la campana de flujo laminar (FILTROS HEPA)

FIGURA 29: VERTIDO DE SOLUTOS Y SOLVENTES



Con ayuda de jeringas procedemos a mezclar los solventes (Agua para jeringas y Suero fisiológico NaCl 0.9%) y preservantes (Hidroximetilcelulosa) junto con los solutos (Fluconazol),

FIGURA 30: HOMOGENIZACION DE SOLUTOS Y SOLVENTES



En la imagen estamos homogenizando nuestra solución colirio

FIGURA 31: ROTULAMOS COLIRIOS DE FLUCONAZOL 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL y 8mg/mL



Rotulamos y finalmente obtenemos como resultado 4 colirios de fluconazol estériles óptimos para el uso clínico.

FIGURA 32: COLIRIOS DE FLUCONAZOL 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL y 8mg/mL



En la imagen se puede apreciar la luna de vidrio que separa la campana de flujo laminar del ambiente.

FIGURA 33: DEPARTAMENTO DE FARMACIA MAGISTRAL H.E.V.E.S



Este Fase de la investigación no hubiese sido posible si el apoyo del departamento de Farmacia Magistral del Hospital de Emergencias de Villa el Salvador, al quienes les estoy muy agradecido, en el especial al Dr. Q.F. Guillermo Gallardo.

FASE EXPERIMENTAL

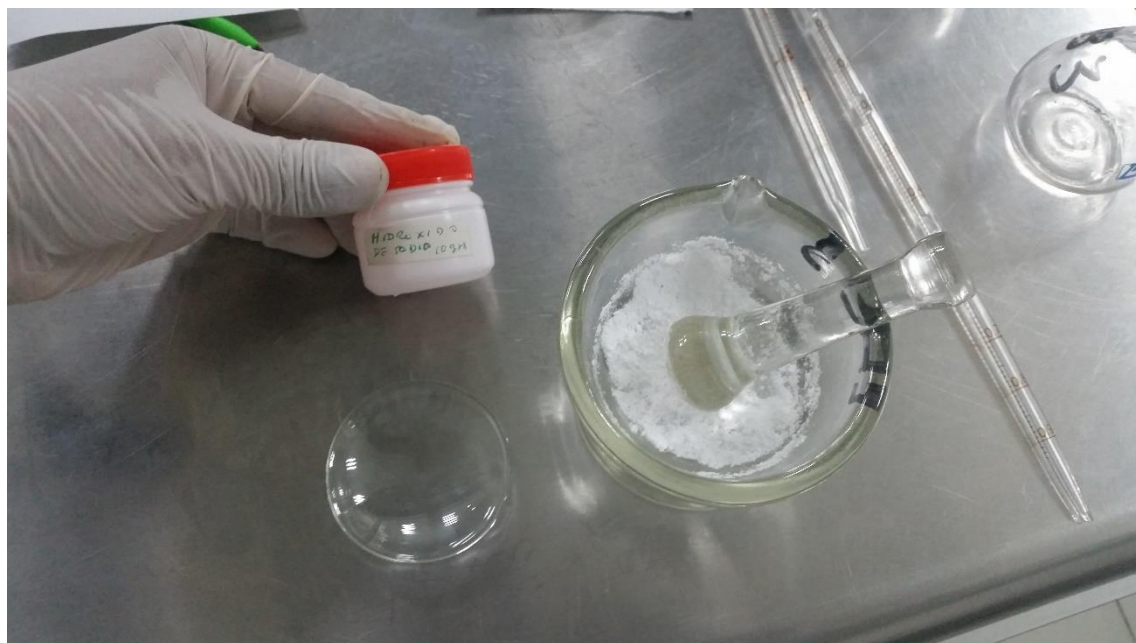
INSTRUMENTOS

- Hidróxido de sodio
- Lauril sulfato de sodio
- Cloruro de sodio
- Fiolas 100mL
- Mortero y pilón
- Pipetas
- Cloruro de sodio
- Ovoscopio
- Pinzas quirúrgicas
- Tijeras quirúrgicas
- Incubadora
- Cronómetros
- Soporte para huevos
- Macroscopio
- Rotuladores
- Balanzas analíticas
- Lunas de reloj
- Vaso Beaker
- Agua destilada
- Baguetas

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Los siguientes reactivos fueron preparados en los laboratorios de especialidad de la facultad de Farmacia y Bioquímica: Lauril Sulfato de Sodio 1N (SDS) y Hidróxido de Sodio 1% (NaOH) al momento de realizar el método.

FIGURA 34: CRISTALES DE NaOH.



Molienda de los cristales de NaOH

FIGURA 35: LAURIL SULFATO DE SODIO QP (SDS).



FIGURA 36: PESAJE DE INDICADORES



FIGURA 37: PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS SDS Y NaOH



FIGURA 38: COLIRIOS DE FLUCONAZOL DE 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL y 8mg/mL



FIGURA 39: ABRIMOS LA INCUBADORA Y SACAMOS UN HUEVO

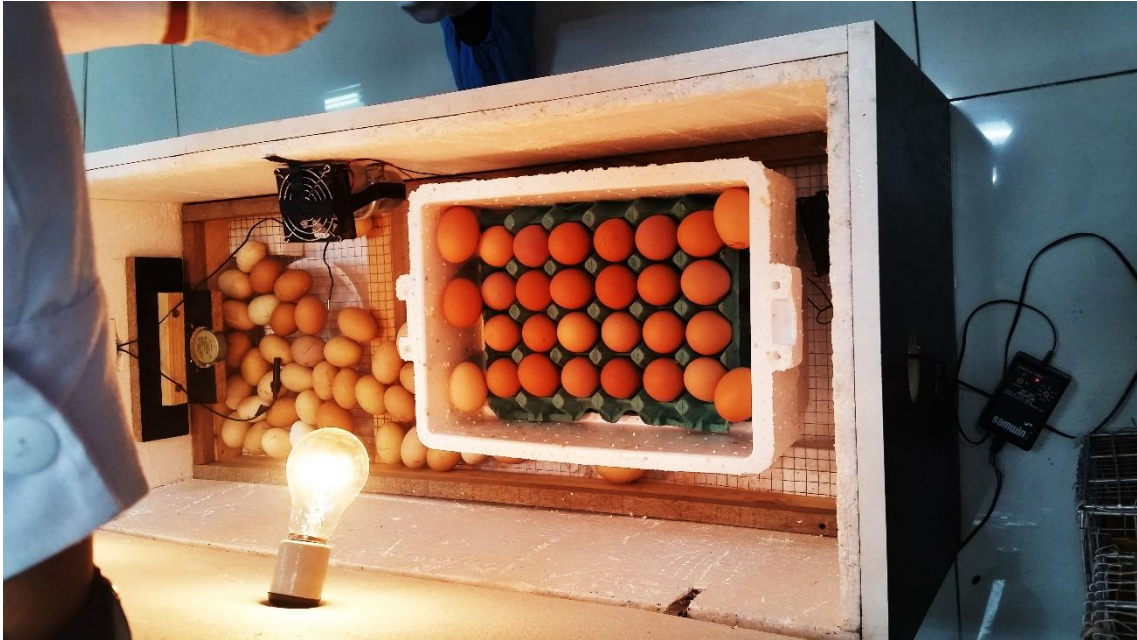
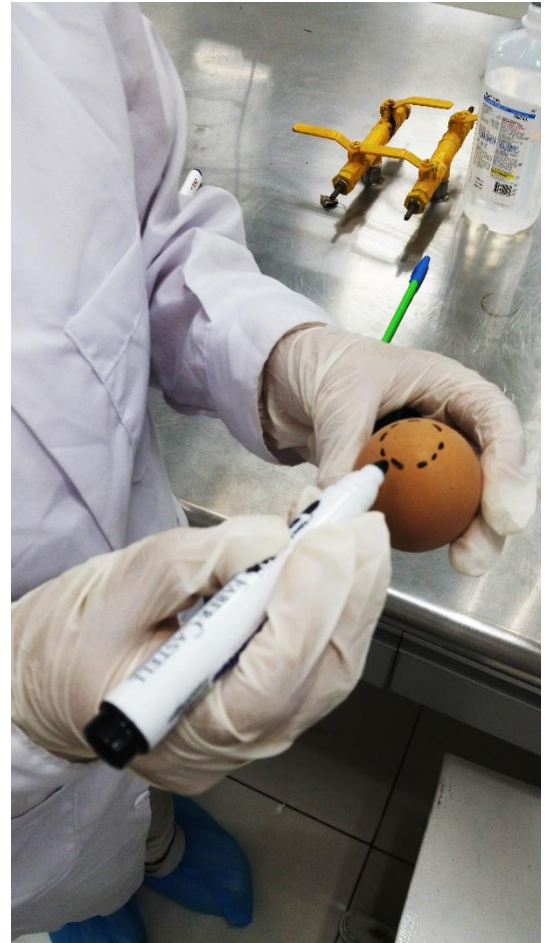
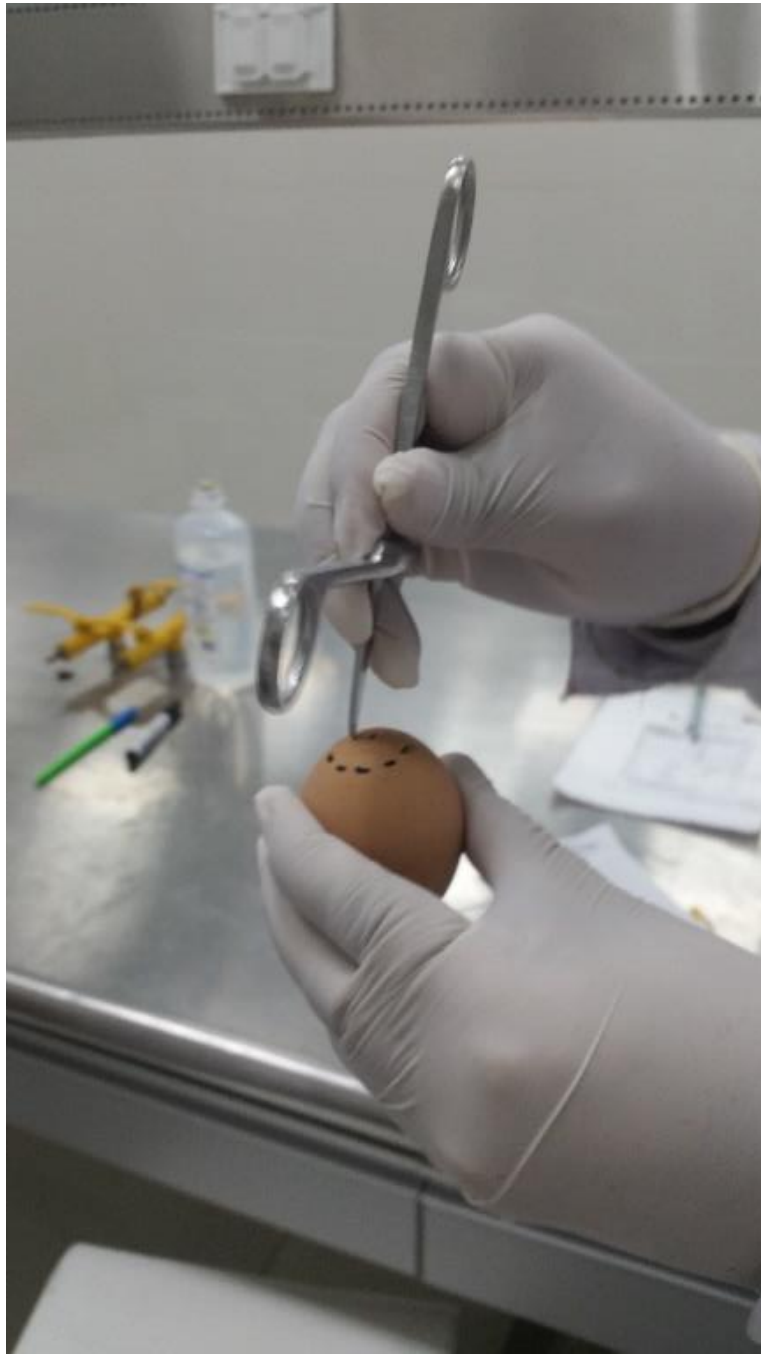


FIGURA 40: INICIO DEL METODO HET-CAM



Tomamos un huevo de la incubadora y ubicamos la zona de la cámara de aire delineamos para minimizar el error técnico.

FIGURA 41: PROCEDEMOS DELINEAR LA CÁMARA DE AIRE



Procedemos a romper la cascara con pequeños golpes cuidadosamente. Encontraremos la membrana que cubre la membrana Corioalantoidea.

FIGURA 42: EXTRACCIÓN DE LA CASCARA



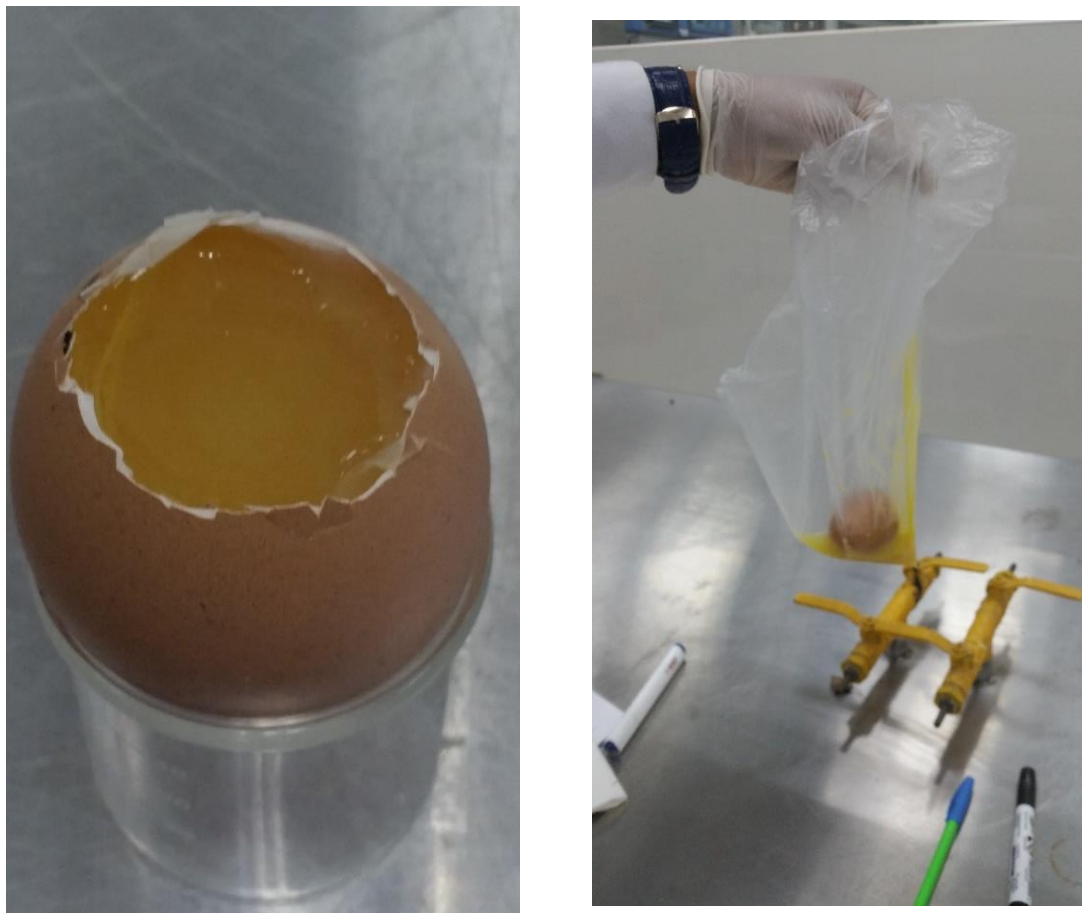
Ayudándonos de una pinza estéril procedemos a extraer las pequeñas porciones de cascara.

FIGURA 43: PROCEDEMOS A RETIRAR LA MEMBRANA DE LA CÁMARA DE AIRE



Previamente hay que humedecer con suero fisiológico la membrana calcio de la cámara de aire por cinco minutos.

FIGURA 44: HUEVO INFERTIL



El huevo evaluado resulto ser infértil procedemos a desecharlo

FIGURA 45: NUEVO HUEVO

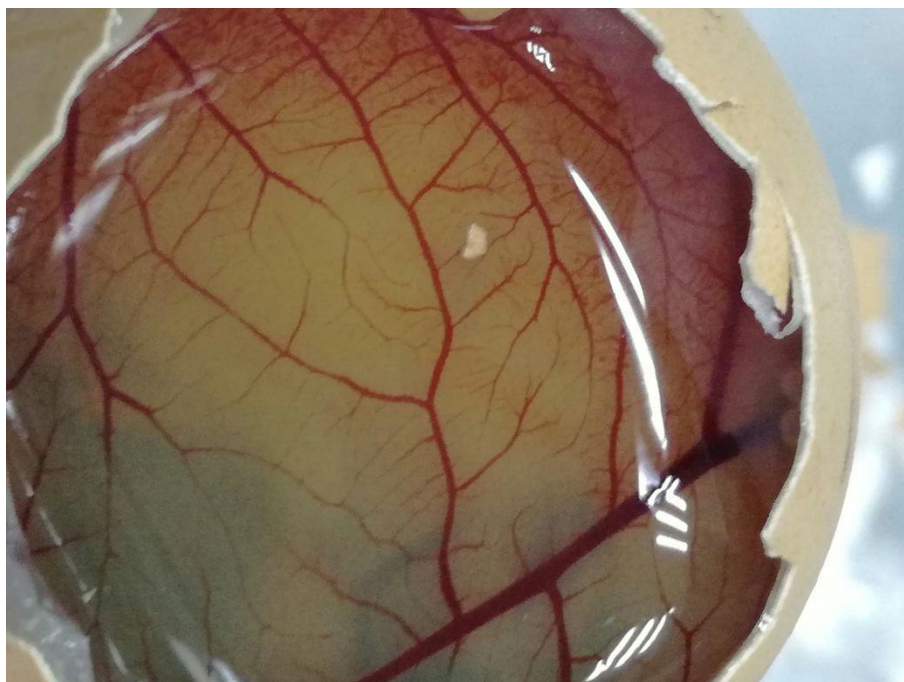


Probamos con un nuevo huevo resultando óptimo para realizar la prueba HET CAM.

FIGURA 46: APERTURA DEL HUEVO FERTIL



FIGURA 47: HUEVO FERTIL - MEMBRANA CORIOALANTOIDEA



3.6 Procesamiento de datos

- Se procesó la información dividiendo los datos en 4 grupos donde:
 - Grupo I: consta de 20 ensayos HET-CAM de Colirios de Fluconazol a 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL y 8mg/mL.
 - Grupo II: consta de 20 ensayos HET-CAM de Colirios de Fluconazol a 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL y 8mg/mL.
 - Grupo III: consta de 20 ensayos HET-CAM de Colirios de Fluconazol a 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL y 8mg/mL.
 - Grupo IV: consta de 20 ensayos HET-CAM de los controles positivo, negativo, blanco y Nafazolina.
- El análisis y procesamiento de datos se realizó con Software SPSS versión 22 para Windows y el programa Microsoft Excel 2016.

CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Presentación de resultados

- Los colirios de fluconazol se elaboraron en el departamento de farmacia magistral del Hospital de Emergencias de Villa el Salvador.
- El método HET- CAM se realizó en el laboratorio de especialidad de toxicología de la facultad de farmacia y bioquímica de la universidad inca Garcilaso de la vega.

Método HET-CAM

Siguiendo los lineamientos de invitox 96, luego de 5 minutos de exposición de la sustancia a analizar es tiempo suficiente para revelar efectos tóxicos e irritantes, según los autores del método la exposición adicional es irrelevante para determinar algún daño de membrana. ⁽⁵⁾

FIGURA 48: CONTROL NEGATIVO NaCl 0.9%

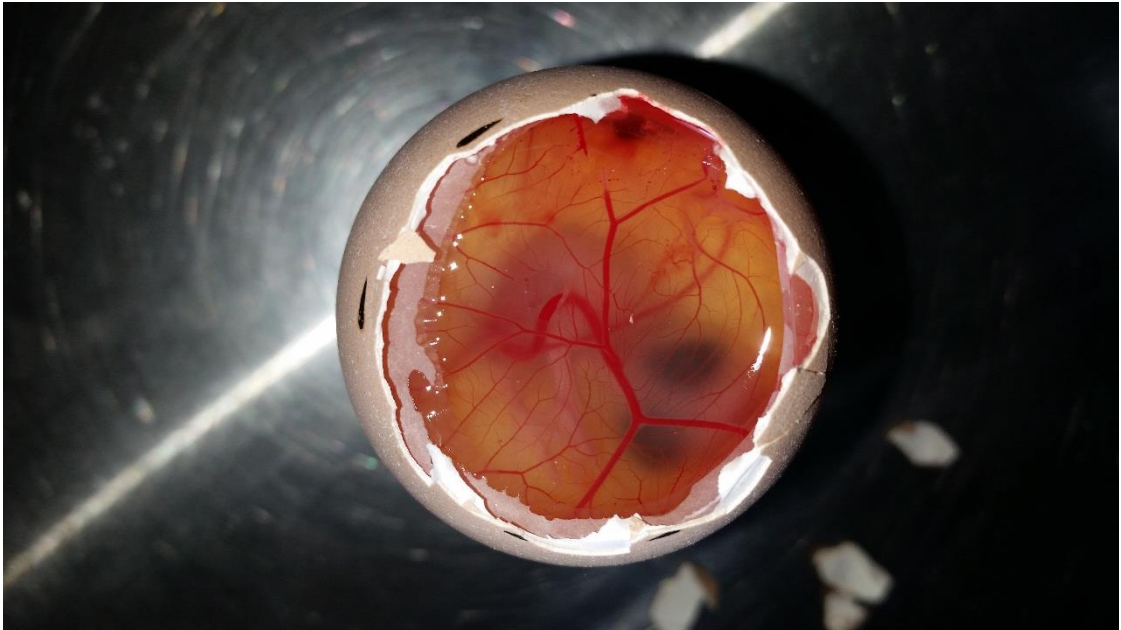
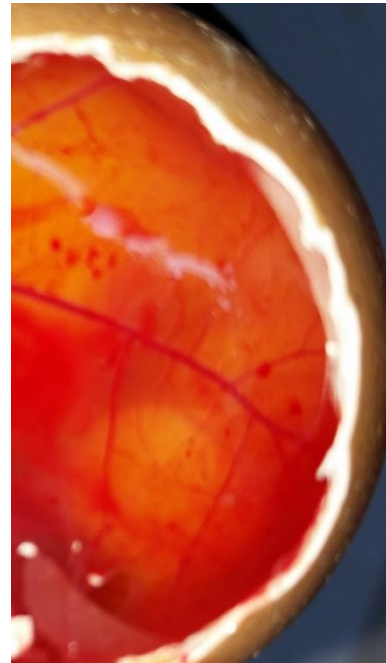


FIGURA 49: RESULTADO CONTROL NEGATIVO NaCl 0.9%



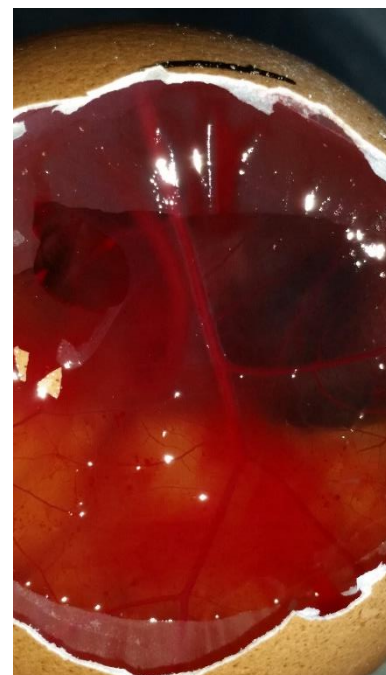
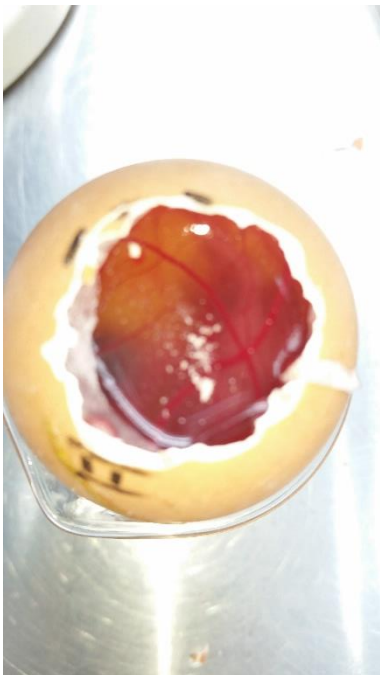
Control negativo NaCl 0.9% sin reacción

FIGURA 50: CONTROL POSITIVO Y RESULTADO DE NaOH 1%



control positivo NaOH 1% se observa lisis hemorragia y ligera coagulación.

FIGURA 51: CONTROL POSITIVO II Y RESULTADO DE LAURIL SULFATO DE SODIO 1N



Prueba de control positivo Lauril Sulfato de sodio se observa hemorragia y coagulación.

FIGURA 52: PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 2mg/mL



Probamos con un nuevo huevo resultando óptimo para realizar la prueba HET CAM usamos nuestro colirio de Fluconazol de 2mg/mL observamos la reacción por 300 segundos.

FIGURA 53: RESULTADO PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 2mg/mL



Después de 300 segundo frente al reactivo de 2mg/mL no se observa reacción

FIGURA 54: PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 4mg/mL

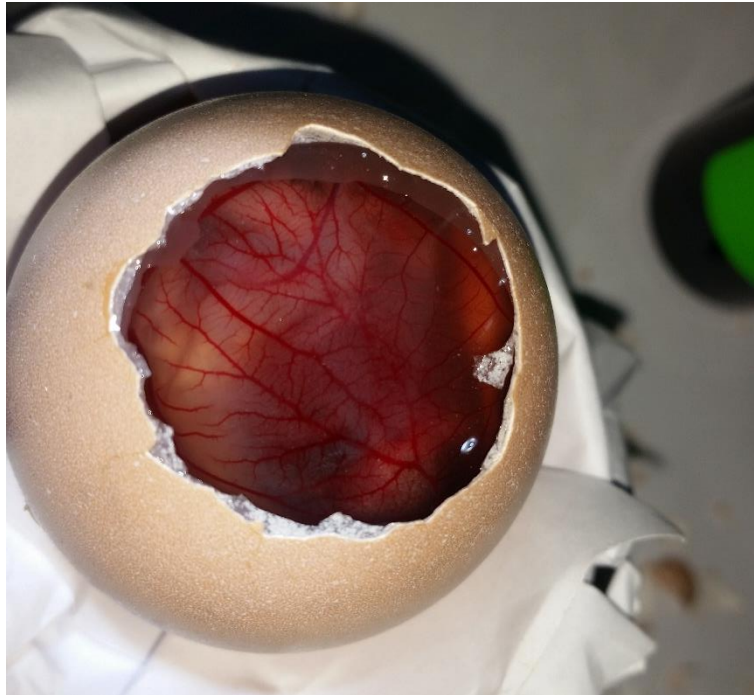
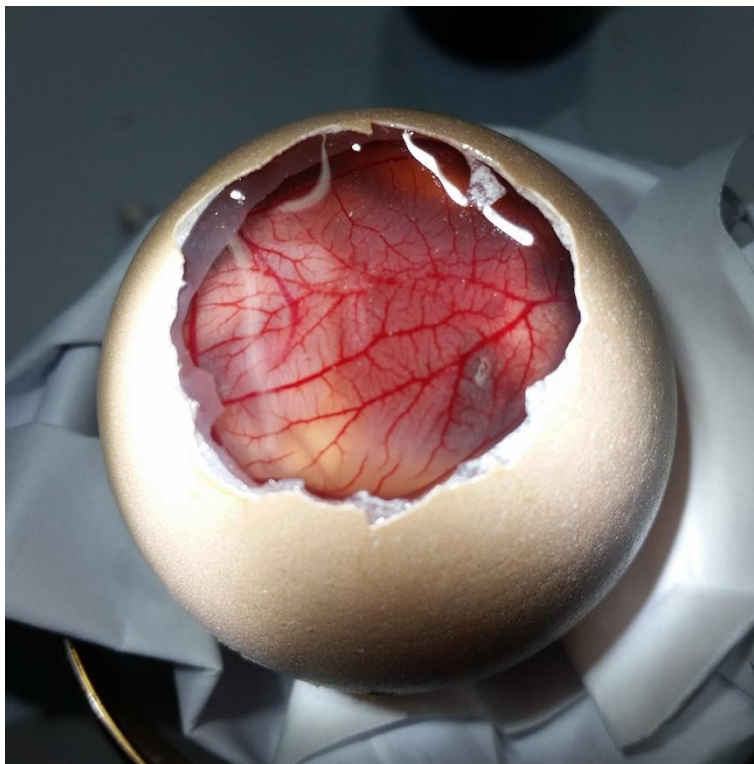


FIGURA 55: RESULTADO PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 4mg/mL



Prueba con 4mg/mL sin reacción

FIGURA 56: PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 6mg/mL

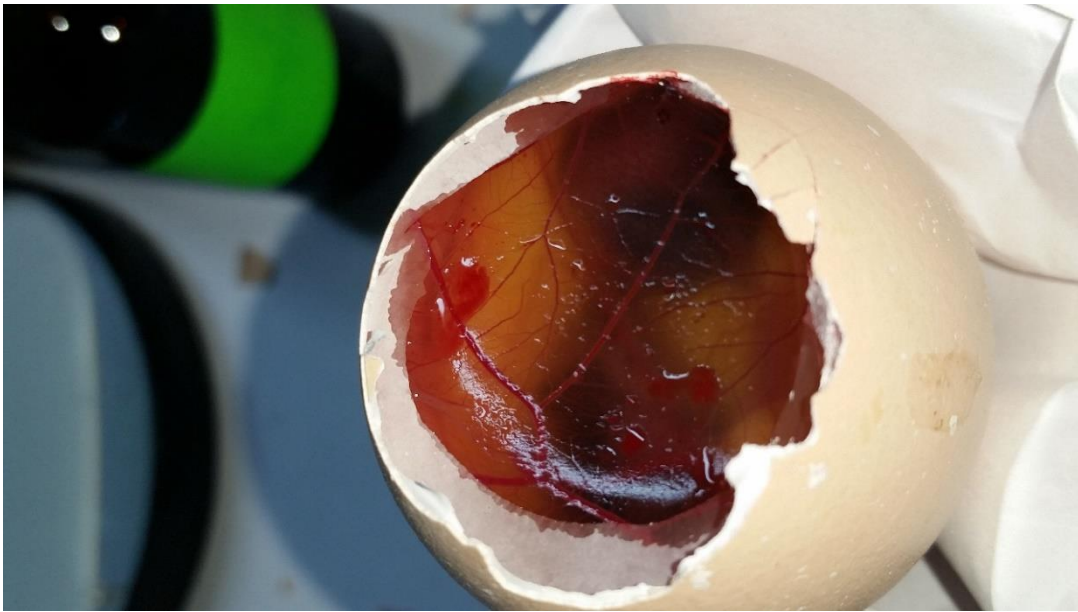


FIGURA 57: RESULTADO PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 6mg/mL

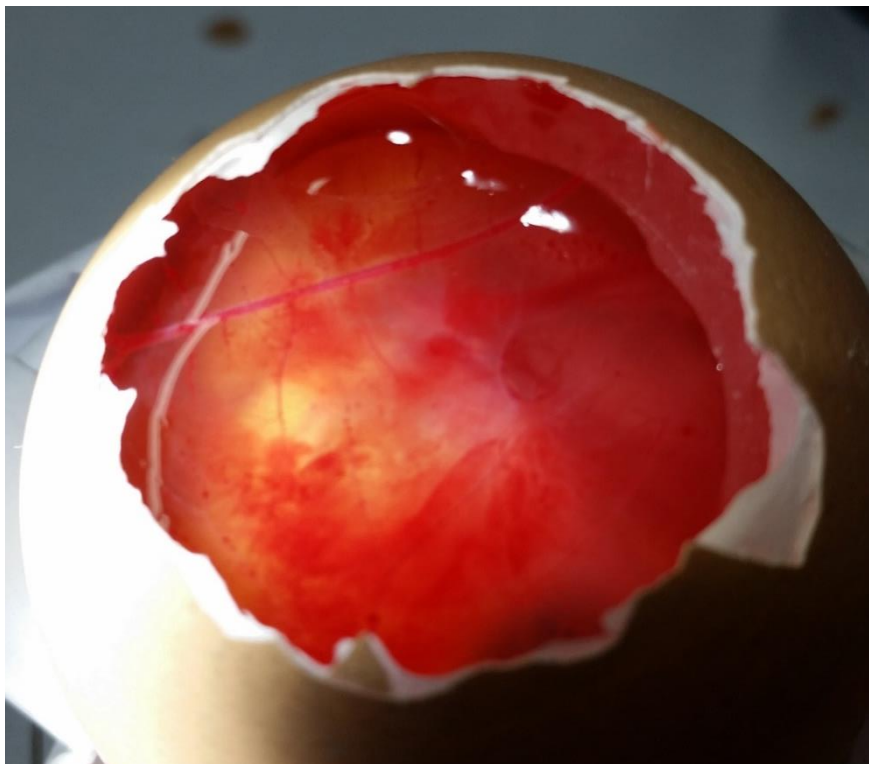


el colirio 6mg/mL Podemos observar hemorragia y coagulación

FIGURA 58: PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 8mg/mL



FIGURA 59: RESULTADO PRUEBA HET CAM COLIRIO DE FLUCONAZOL DE 8mg/mL



Colirio 8mg/mL Podemos observar marcada hemorragia, lisis y coagulación.

TABLA 5: Resultados de los controles del método Het – Cam / control negativo Suero fisiológico NaCl 0.9% (Grupo IV)

Control Negativo	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
NaCl 9% I	301	301	301	0	NO IRRITANTE
NaCl 9% II	301	301	301	0	NO IRRITANTE
NaCl 9% III	301	301	301	0	NO IRRITANTE
NaCl 9% IV	301	301	301	0	NO IRRITANTE
NaCl 9% V	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO				0	NO IRRITANTE

suero fisiológico siendo más sustancia de pH neutro no produce reacciones tóxicas e irritantes en la membrana Corioalantoidea. Resultado una sustancia no irritante.

TABLA 6: Resultados de los controles del método Het – Cam / Control Positivo I NaOH 0.1N (Grupo IV)

Control Positivo I	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
NaOH 0.1N I	85	181	155	11.42	IRRITANTE SEVERO
NaOH 0.1N II	40	82	210	12.47	IRRITANTE SEVERO
NaOH 0.1N III	35	80	214	12.5	IRRITANTE SEVERO
NaOH 0.1N IV	16	37	223	13.39	IRRITANTE SEVERO
NaOH 0.1N V	46	86	180	13.16	IRRITANTE SEVERO
PROMEDIO				12.58	IRRITANTE SEVERO

El hidróxido de sodio siendo una sustancia alcalina (base fuerte) produce reacciones en la membrana Corioalantoidea. Se puede observar lisis, Hemorragias y coagulación Resultando una sustancia irritante severa.

TABLA 7: Resultados de los controles del método Het – Cam / Control Positivo II Lauril Sulfato SDS 1% (Grupo IV)

Control Positivo II	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
Lauril Sulfato SDS 1% I	124	161	175	10.24	IRRITANTE SEVERO
Lauril Sulfato SDS 1% II	120	149	160	10.99	IRRITANTE SEVERO
Lauril Sulfato SDS 1% III	110	150	170	10.90	IRRITANTE SEVERO
Lauril Sulfato SDS 1% IV	112	150	163	11.07	IRRITANTE SEVERO
Lauril Sulfato SDS 1% V	128	147	195	9.78	IRRITANTE SEVERO
PROMEDIO				10.59	IRRITANTE SEVERO

El Lauril sulfato de sodio del usado en industrial cómo detergente por su tenso activo iónico, empleado en diversos productos de higiene personal como pasta de dientes, champú y jabones de baño, entre los efectos dañinos están remover aceites y grasas de la piel, y causar irritación en piel y ojos. Por sus propiedades irritantes es usada en el método HET-CAM como un control positivo Según nuestras pruebas Lauril sulfato produce lisis, hemorragia Y coagulación. concluyendo que Lauril sulfato de sodio es un Irritante severo.

TABLA 8: Resultados de los controles del método Het – Cam / estándar colirio de Nafazolina (Grupo IV)

STANDAR	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
Nafazolina I	301	301	301	0	NO IRRITANTE
Nafazolina II	301	301	301	0	NO IRRITANTE
Nafazolina III	301	301	301	0	NO IRRITANTE
Nafazolina IV	301	301	301	0	NO IRRITANTE
Nafazolina V	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO				0	NO IRRITANTE

Es un simpaticomimético, una imidazolina descongestiva que produce estimulación directa de los receptores α -adrenérgicos del sistema nervioso simpático, produciendo vasoconstricción. Actúa como descongestivo oftálmico. **Por los altos controles de seguridad concerniente a la irritabilidad dérmica y oftálmica es usado en nuestra investigación como punto de referencia estándar.**

TABLA 9: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 2mg/mL (Grupo I)

Fluconazol 2mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
1	301	301	301	0	NO IRRITANTE
2	301	301	301	0	NO IRRITANTE
3	301	301	301	0	NO IRRITANTE
4	301	301	301	0	NO IRRITANTE
5	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO					NO IRRITANTE

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC} / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 10: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 4mg/mL (Grupo I)

Fluconazol 4mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
6	301	301	301	0	NO IRRITANTE
7	301	301	301	0	NO IRRITANTE
8	301	301	301	0	NO IRRITANTE
9	301	301	301	0	NO IRRITANTE
10	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO					NO IRRITANTE

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC}) / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 11: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 6mg/mL (Grupo I)

Fluconazol 6mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
11	68	301	301	5.44	IRRITANTE MODERADO
12	90	301	301	4.92	IRRITANTE LEVEL
13	55	301	301	5.74	IRRITANTE MODERADO
14	50	301	301	5.86	IRRITANTE MODERADO
15	57	301	301	5.69	IRRITANTE MODERADO
PROMEDIO				5.53	IRRITANTE MODERADO

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC}) / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 12: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 8mg/mL (Grupo I)

Fluconazol 8mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
16	20	25	155	15.54	IRRITANTE SEVERO
17	15	30	276	11.94	IRRITANTE SEVERO
18	17	52	301	10.78	IRRITANTE SEVERO
19	45	88	126	14.77	IRRITANTE SEVERO
20	48	85	113	15.14	IRRITANTE SEVERO
PROMEDIO				13.63	IRRITANTE SEVERO

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC}) / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 13: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 2mg/mL (Grupo II).

Fluconazol 2mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
1	301	301	301	0	NO IRRITANTE
2	301	301	301	0	NO IRRITANTE
3	301	301	301	0	NO IRRITANTE
4	301	301	301	0	NO IRRITANTE
5	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO				0	NO IRRITANTE

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC} / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

**TABLA 14: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio
Fluconazol 4mg/mL (Grupo II)**

Fluconazol 4mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
6	301	301	301	0	NO IRRITANTE
7	301	301	301	0	NO IRRITANTE
3	301	301	301	0	NO IRRITANTE
9	301	301	301	0	NO IRRITANTE
10	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO				0	NO IRRITANTE

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC} / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 15: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 6mg/mL (Grupo II)

Fluconazol 6mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
11	72	301	301	5.34	IRRITANTE MODERADO
12	68	301	301	5.43	IRRITANTE MODERADO
13	65	301	301	5.50	IRRITANTE MODERADO
14	93	301	301	4.85	IRRITANTE LEVEL
15	76	301	301	5.25	IRRITANTE MODERADO
PROMEDIO				5.27	IRRITANTE MODERADO

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC} / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 16: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 8mg/mL (Grupo II)

Fluconazol 8mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
16	17	56	160	14.94	IRRITANTE SEVERO
17	31	63	154	14.67	IRRITANTE SEVERO
18	22	57	124	15.88	IRRITANTE SEVERO
19	35	80	214	12.50	IRRITANTE SEVERO
20	40	82	210	12.47	IRRITANTE SEVERO
PROMEDIO				14.09	IRRITANTE SEVERO

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC}) / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

**TABLA 17: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio
Fluconazol 2mg/mL (Grupo III)**

Fluconazol 2mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
1	301	301	301	0	NO IRRITANTE
2	301	301	301	0	NO IRRITANTE
3	301	301	301	0	NO IRRITANTE
4	301	301	301	0	NO IRRITANTE
5	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO				0	NO IRRITANTE

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC}) / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 18: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 4mg/mL (Grupo III)

Fluconazol 4mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
6	301	301	301	0	NO IRRITANTE
7	301	301	301	0	NO IRRITANTE
3	301	301	301	0	NO IRRITANTE
9	301	301	301	0	NO IRRITANTE
10	301	301	301	0	NO IRRITANTE
PROMEDIO				0	NO IRRITANTE

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC}) / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

TABLA 19: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio Fluconazol 6mg/mL (Grupo III)

Fluconazol 6mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
11	70	301	301	5.39	IRRITANTE MODERADO
12	67	301	301	5.46	IRRITANTE MODERADO
13	80	301	301	5.15	IRRITANTE MODERADO
14	85	301	301	5.04	IRRITANTE MODERADO
15	75	301	301	5.27	IRRITANTE MODERADO
PROMEDIO				5.26	IRRITANTE MODERADO

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC}) / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

**TABLA 20: Resultados de los controles del método Het – Cam colirio
Fluconazol 8mg/mL (Grupo III)**

Fluconazol 8mg/mL	Lisis	Hemorragia	Coagulación	I.I	Clasificación
16	18	28	158	15.44	IRRITANTE SEVERO
17	17	41	215	13.54	IRRITANTE SEVERO
18	16	37	223	13.39	IRRITANTE SEVERO
19	31	92	170	13.71	IRRITANTE SEVERO
20	46	86	180	13.16	IRRITANTE SEVERO
PROMEDIO				13.85	IRRITANTE SEVERO

$$I.I = (301 - \text{seg TH} / 300) 5 + (301 - \text{seg TL} / 300) 7 + (301 - \text{seg TC} / 300) 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación

TH = Tiempo de aparición de hemorragia

TL = Tiempo de aparición de lisis

TC = Tiempo de aparición de coagulación

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS IRRITANTES
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

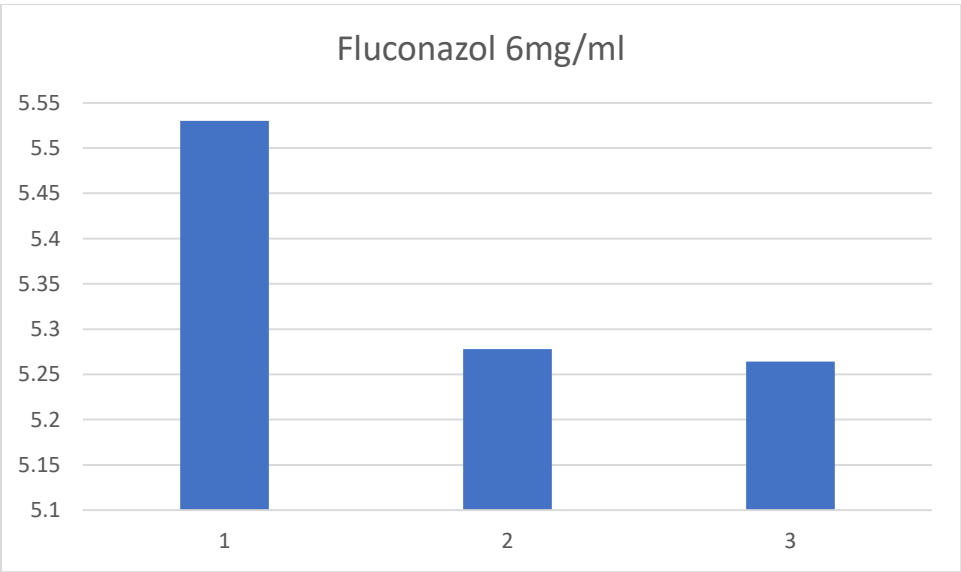
Análisis de los Resultados por Grupos: I - II – III.

Se Analizó los promedios de los resultados de cada grupo, se omitieron los resultados de los grupos con colirios de concentración 2mg/mL y 4 mg/mL por poseer un mismo resultado en todo el ensayo.

TABLA 21: ANÁLISIS DE RESULTADOS POR GRUPOS.

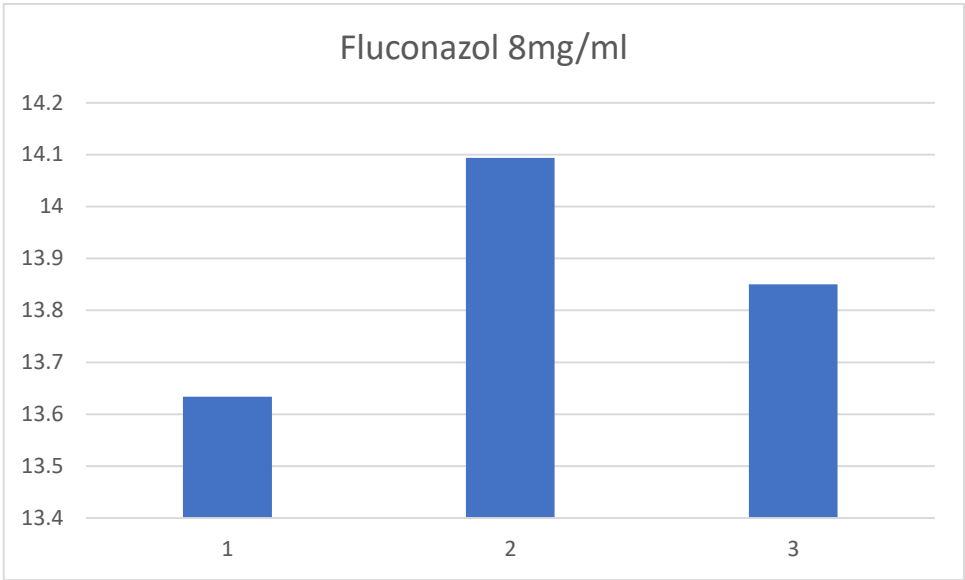
ANÁLISIS DE RESULTADOS POR GRUPOS			
COLIRIOS	PROMEDIO GRUPO I	PROMEDIO GRUPO II	PROMEDIO GRUPO III
Fluconazol 2mg/mL	0	0	0
Fluconazol 4mg/mL	0	0	0
Fluconazol 6mg/mL	5.53	5.27	5.26
Fluconazol 8mg/mL	13.63	14.09	13.85

Figura 60: Análisis de los Resultados de los colirios de 6mg/mL de los Grupos I - II - III



El colirio de Fluconazol 6mg/mL se mantiene en un rango de índice de irritabilidad que va desde 5.1 hasta 5.55 lo cual denota su potencial irritante (irritante severo).

Figura 61: Análisis de los Resultados de los colirios de 8mg/mL de los Grupos I - II - III



El colirio de Fluconazol 8mg/mL se mantiene en un rango de índice de irritabilidad que va desde 13.4 hasta un pico 14.2 lo cual denota su potencial irritante (irritante severo) altamente tóxico.

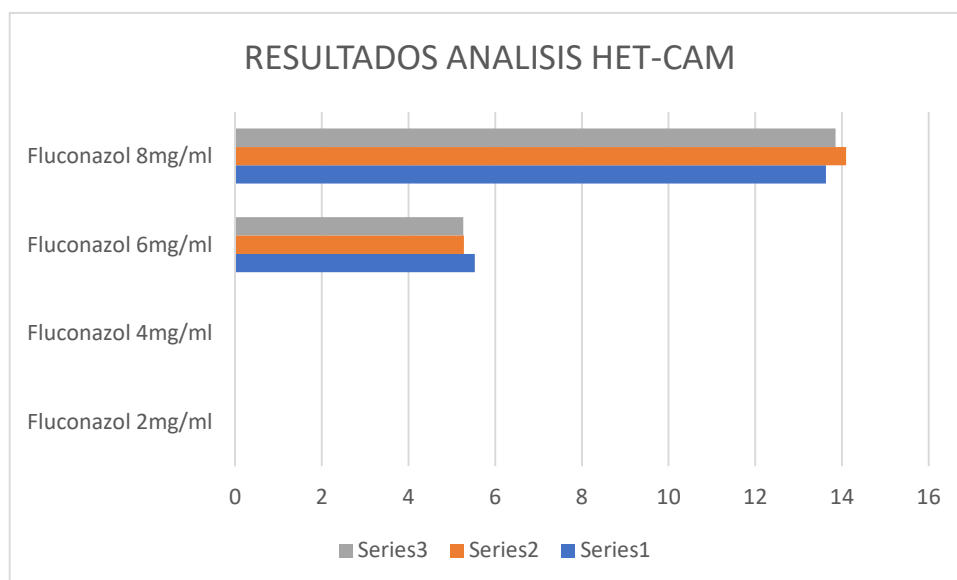
TABLA 22: ANÁLISIS DE DESVIACION ESTANDAR DE LOS GRUPOS I-II-III.

ANÁLISIS DE DESVIACION ESTANDAR GRUPO I	
desviación estándar de 2mg/mL	0
desviación estándar de 4mg/mL	0
desviación estándar de 6mg/mL	0.37
desviación estándar de 8mg/mL	2.13

ANÁLISIS DE DESVIACION ESTANDAR GRUPO II	
desviación estándar de 2mg/mL	0
desviación estándar de 4mg/mL	0
desviación estándar de 6mg/mL	0.26
desviación estándar de 8mg/mL	1.54

ANÁLISIS DE DESVIACION ESTANDAR GRUPO III	
desviación estándar de 2mg/mL	0
desviación estándar de 4mg/mL	0
desviación estándar de 6mg/mL	0.17
desviación estándar de 8mg/mL	0.91

Figura 62: Análisis de los Resultados de los colirios de 2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL y 8mg/mL de los Grupos I - II – III.



El colirio de fluconazol 2 mg/mL, 4 mg/mL, respectivamente posee un índice de irritabilidad 0 lo cual los hace seguro y pueden ser usado en la farmacoterapia a partir 6 mg/mL y 8mg/mL observamos niveles de toxicidad severos los índices de toxicidad se mantienen en un rango de 5 en el caso del colirio de 6mg/mL y suben hasta un máximo de 14.1 en el caso de la más alta concentración.

4.2 Contrastación de hipótesis.

1. Formulación de la hipótesis General.

Ha: La toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol analizadas por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de emergencias Villa El Salvadores Baja.

Ho: La toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol analizadas por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de emergencias Villa El Salvador no es Baja.

2. Prueba Estadística.

T de Student para dos muestras relacionadas - Prueba paramétrica.

3. Elección de nivel de significancia.

$$\alpha = 0,05$$

4. Regla de decisión

Si $p < \alpha$ entonces se rechaza la hipótesis nula.

5. Cálculos estadísticos

Si $p < \alpha$ entonces se rechaza la hipótesis nula.

Tabla 23. Análisis de la toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol por el método HET-CAM en hospital de emergencias Villa El Salvador 2018.

Nivel de toxicidad ocular aguda	P
Antes de análisis la toxicidad ocular aguda	0.000*
Después del análisis la toxicidad ocular aguda	

*T de Student para dos muestras relacionadas.

Al encontrar un p menor a 0.05 ($p=0.000$), **se rechaza la hipótesis nula**, es decir, el análisis la toxicidad ocular aguda posee un nivel de toxicidad ocular aguda baja de los colirios de fluconazol por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de emergencias Villa El Salvador.

1 Formulación de la Hipótesis específica I.

Ha: La concordancia de los valores: temperatura, humedad, densidad de los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*). Según el protocolo HET-CAM es baja.

Ho: La concordancia de los valores: temperatura, humedad, densidad de los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*). Según el protocolo HET-CAM no es Baja.

2 Prueba Estadística.

No requiere análisis estadístico.

Por los tanto **se rechaza la hipótesis nula**, es decir, La concordancia de los valores: temperatura, humedad, densidad de los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*). Según el protocolo HET-CAM es baja.

1 Hipótesis específica II.

Ha: La toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador es baja.

Ho: La toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador no es baja.

2 prueba Estadística.

Chi cuadrado para dos muestras relacionadas - Prueba paramétrica.

3 Elección de nivel de significancia.

$$\alpha = 0,05$$

4 Regla de decisión

Si $p < \alpha$ entonces se rechaza la hipótesis nula.

5 Cálculos estadísticos

Si $p < \alpha$ entonces se rechaza la hipótesis nula.

Tabla 24. La toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador.

Nivel de toxicidad ocular aguda	P
Antes de análisis la toxicidad ocular aguda	0.000*
Después del análisis la toxicidad ocular aguda	

*Chi cuadrado para dos muestras relacionadas.

Al encontrar un p menor a 0.05 ($p=0.000$), **se rechaza la hipótesis nula**, es decir, La toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador es baja.

1 Hipótesis específica III.

Ha: Existen concentraciones tóxicas de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina es baja.

Ho: Existen concentraciones tóxicas de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina no es baja

2 Prueba Estadística.

No requiere análisis estadístico.

Por los tanto **se rechaza la hipótesis nula**, es decir Existen concentraciones tóxicas de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina es baja.

4.3 Discusión de resultados.

- Los valores de temperatura, humedad relativa, días de incubado y a su vez los parámetros de peso, tamaño, pruebas de densidad, temperatura de almacenamiento y valores máximos de inicio de incubación de los huevos de gallina *Leghorn* cumplen con los parámetros establecidos en la técnica HET- CAM – INVITTOX (protocolo 47) propuesto por *Luppke* este procedimiento es comparado por el realizado por **Fernández A. et.al. (2014), “Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM”** donde realiza los mismos controles de calidad.
- El grado de toxicidad ocular aguda del colirio de fluconazol a una concentración de: 2mg/mL y 4mg/mL presenta un nivel de toxicidad NO IRRITANTE. 6mg/mL y 8mg/mL presenta un nivel de toxicidad IRRITANTE SEVERO, dichos niveles de toxicidad obtenidos los ensayos HET-CAM están en concordancia con los niveles de toxicidad resultantes del colirio de fluconazol a 2mg/mL realizado por **Fernández A. et.al. (2014), “Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM”** sin embargo no analiza las demás concentraciones.
- Las concentraciones tóxicas del colirio de Nafazolina comparado frente los colirios de fluconazol dieron el siguiente resultado: Nafazolina frente Fluconazol de 2mg/mL y 4mg/mL NO IRRITANTE y Nafazolina frente Fluconazol de 6mg/mL y 8mg/mL IRRITANTE SEVERO, Sin embargo, no existe estudio relacionado de Fluconazol con Nafazolina que pueda discutir mi resultado, por lo tanto, el presente estudio es pionero.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1 Conclusiones.

Los valores de temperatura, humedad relativa, días de incubado y a su vez los parámetros de peso, tamaño, pruebas de densidad, temperatura de almacenamiento y valores máximos de inicio de incubación de los huevos de gallina *Leghorn* cumplen con los parámetros establecidos en la técnica HET-CAM – INVITTOX (protocolo 47).

El grado de toxicidad ocular aguda del colirio de fluconazol a una concentración de: 2mg/mL y 4mg/mL presenta un nivel de toxicidad NO IRRITANTE. 6mg/mL y 8mg/mL presenta un nivel de toxicidad IRRITANTE SEVERO.

Las concentraciones tóxicas del colirio de Nafazolina comparado frente los colirios de fluconazol dieron el siguiente resultado: Nafazolina frente Fluconazol de 2mg/mL y 4mg/mL NO IRRITANTE. Nafazolina frente Fluconazol de 6mg/mL y 8mg/mL IRRITANTE SEVERO.

5.2 Recomendaciones.

1. Revisar el estado de los huevos fecundados a partir del 7 para evitar las formaciones del embrión y con llevaría dificultades en la prueba het cam.
2. Preparar los insumos y reactivos a utilizarse en el momento de realización de la técnica het cam.
3. La realización de más investigaciones que aporte al tratamiento de enfermedades que comprometan la visión.
4. Se recomienda continuar los estudios de irritabilidad con otros fármacos con la finalidad de proponer alternativas de curación de las demás variaciones de queratitis ocular.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Whitcher JP SMUM. Corneal blindness: a global perspective. World Health Organ. 2001; 79(3): p. 214-221.
2. Passos RM CAYMHLA. Microbial keratitis in the elderly - a 32-year review. São Paulo; 2010.
3. AL FME. Queratitis fúngica: revisión actual sobre diagnóstico y tratamiento. Arq Bras Oftalmol. 2013; 76(1): p. 52-6.
4. Alonso Herreros JM LGSMM. Evaluación de la combinación tobramicina-cefazolina tópica en úlceras corneales. Farm Hosp; 1997.
5. AL ItE. Estabilidad y actividad in vitro de voriconazol en colirio a una concentración de 3 g/mL. Farm Hosp; 2005.
6. García Salom P AHJ. El real decreto de medicamentos en situación especiales y farmacotecnia hospitalaria. , Farm Hosp; 2010.
7. AL ICE. Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu. investigación. Lima: USMP; 2013.
8. Balls M BPBL. international validation study on alternatives to the draize eye irritation test toxicology in vitro . In.; 1995. p. 871-929.
9. MK P. The draize eye test and in vitro alternative; a left-handed marriage? In Toxicology in vitro .; 2006. p. 78-81.
10. Figueredo N, García G, Vega R, Altunaga L. Utilización del método alternativo HET-CAM en la evaluación toxicológica de productos cosméticos y materias primas. Alimentaria. 2000; 317: p. 161-166.
11. el peruano. ley Nª 30407 - ley de protección y bienestar animal. 2016.
12. El peruano. Ley 27265 - Ley de Protección a los Animales Domésticos y a los Animales Silvestres mantenidos en cautiverio. 2000 mayo 19.
13. Osorio aMd. ética en la investigación con modelos animales experimentales. alternativas y las 3 RS de Russell. una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. revista colombiana de Bioética. 2006 enero; 1(1).
14. Pita D, Fontenla JR, Grau M, Díaz M. (1994). Diccionario terminológico de oftalmología. Madrid I.M.&C.
15. Allan BDS DJ. strategies for the management of microbial keratitis. Br J Ophthalmol. In.; 1995;79. p. 777-786.
16. Pepose JS, Wilhelmus KR. Divergent approaches to the management of corneal ulcers. Am J ophthalmol. 1992; 114: 630-632.;

17. Gálvez A, Bengoa A (2001). Queratitis Micótica. En Bengoa A, Gutierrez E y Perez E (Eds.). Atlas de urgencia en oftalmología. Barcelona: Ed Glosa. : p. 152.
18. Wilhelmus KR, Robinson NM, Font RA, Hamill MB, Jones D.B. Fungal keratitis in contact lens wearers. Am J Ophthalmol. 1988; 106:706-8..
19. Srinivasan M. Fungal keratitis. Curr Opin Ophthalmol. 2004;15:321-327..
20. Seal D, Bron A, Hay J. (1998). Ocular Infection (1ª Ed.). London: Martin Dunitz.
21. Kanski J.(2003). Oftalmología Clínica (5ta Edición).Elsevier.
22. Vaughan D, Asbury T. (2004). Oftalmología General (13va edición); Chile: Manual Moderno.
23. Ruiz P., Ushiñau M. "Evaluación del potencial irritante de la crema cosmética "baba de caracol & concha de nacar" comercializada en el mercado de belén en Oryctolagus cuniculus cepa New Zealand. Iquitos peru 2013.
24. Taype E. "Estandarización y validación del método de Het- Cam para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de los cinco frutos nativos del Perú" UNMSM.2015.
25. Kuch M., Carpio C. "Evaluación del potencial irritante del aceite esencial de aniba rosaeodora ducke "palo de rosa" en oryctolagus cuniculus cepa new zealand – Iquitos, 2014" UPS 2014.
26. Marcial Pipa; Brenda Moy. "Evaluación in vitro de la irritabilidad ocular en mucílagos de cinco especies vegetales de interés, mediante el método HET-CAM" Lima Perú 2015.
27. Fontenla J, Vázquez X; Grau M, Pita D. Diagnóstico y tratamiento de las queratitis. La Medicina Hoy; 61 (1409). 16-23. Disponible en: <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/61/1409/57/1v61n1409a13022361pdf001.pdf>
28. Singh D. (2013). Fungal Keratitis. Department of Ophthalmology, Guru Nanak Dev University. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/1194167-overview#a0104>.
29. Rymgayło-Jankowska B, Rakowska E, Haszcz D, Kudasiewicz-Kardaszewska A, Suchodoła-Ratajewicz E, Bielińska A, et al. Fungal

- infections of the cornea: diagnostics and management. *Klinika Oczna*. 2007;109:475-8.
- 30.. Gopinathan U, Garg P, Fernandes M, Sharma S, Athmanathan S, Rao GN. The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care center in South India. *Cornea*. 2002; 21: 555-9.
- 31.. Sharma S, Kunimoto DY, Gopinathan U, Athmanathan S, Garg P, Rao GN. Evaluation of corneal scraping smear examination methods in the diagnosis of bacterial and fungal keratitis: a survey of eight years of laboratory experience. *Cornea*. 2002; 21: 643-7.
- 32.. Ferrer C, Alio JL. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2011; 1:15-22.
33. Goldschmidt P, Degorge S, Benallaoua D, Semoun O, Borsali E, Le Bouter A, et al. New strategy for rapid diagnosis and characterization of keratomycosis. *Ophthalmology*. 2012;119:945-50.
- 34.. Kuo M, Chang H, Cheng C, Chien C, Fang P, Chang T. A Highly Sensitive Method for Molecular Diagnosis of Fungal Keratitis. *Ophthalmology*. 2012;119(12):2434-42
35. Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16:730-797.
36. Prajna N, John R, Nirmalan P, Lalitha P, Srinivasan M. A randomised clinical trial comparing 2% econazole and 5% natamycin for the treatment of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:1235- 1237.
- 37.. FlorCruz (2008). Medical interventions for fungal keratitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008: CD004241.
- 38.. Badriyeh D, Neoh C, Stewart K, Kong D. Clinical utility of voriconazole eye drops in ophthalmic fungal keratitis. *Clin Ophthalmol*. 2010;4 391-405 [[Links](#)]

39. Morand K, Bartoletti A, Bochot A, Barratt G, Brandely M, Chast F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: Physico-chemical and formulation stability. *Int J Pharm.* 2007;1;344(1- 2):150-3.
40. Cannon Jh, Fiscella R, Pattharachayakul S, Garey K, De Alba F, Piscitelli S, et al. Comparative toxicity and concentrations of intravitreal amphotericin B formulations in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44, 2112-2117.
41. Kalavathy C, Parmar P, Kaliyamurthy J, Philip V, Ramalingam M, Jesudasan C, et al. Comparison of Topical Itraconazole 1% With Topical Natamycin 5% for the Treatment of Filamentous Fungal Keratitis. *Cornea.* 2005;24:449-452
42. Sonogo S, Sanchez D, Ayala R, Torres G, Ta C, Barbosa L, et al. Clinical results of topical fluconazole for the treatment of filamentous fungal keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244(7):782-7.
43. Yilmaz S, Maden A. Severe Fungal Keratitis Treated With Subconjunctival Fluconazole. *Am J Ophthalmol.* 2005;140(3):454-8.
44. Prajna P, Nirmalan P, Mahalakshmi R, Lalitha P, Srinivasan M. Concurrent use of 5% natamycin and 2% econazole for the management of fungal keratitis. *Cornea.* 2004; 23(8), 793-796.
45. Scott LJ, Simpson D, Voriconazole : a review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs.* 2007;67(2):269-98.
46. Sponcel W, Chen N, Dang D, Paris G, Graybrill J, Najvar L, et al. Topical Voriconazole as a Novel Treatment for Fungal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1): 262-268.
47. Prajna N, Mascarenhas J, Krishnan T, Reddy P, Prajna L, Srinivasan M, et al. Comparison of Natamycin and Voriconazole for the Treatment of Fungal Keratitis. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(6):672-8.
48. Prakash G, Goel M, Jeewan S, Evaluation of Intrastromal Injection of Voriconazole as a Therapeutic Adjunctive for the Management of Deep Recalcitrant Fungal Keratitis. *Am J Ophthalmol* 2008;146 :56-59.

49. Al-Badriyeh D, Leung L, Davies GE, Stewart K, Kong D. Successful use of topical voriconazole 1% alone as first-line antifungal therapy against *Candida albicans* keratitis. *Ann Pharmacother.* 2009;43(12):2103-7.
50. José Eulogio; Liz Miranda. "Variante del ensayo de la membrana Corioalantoidea (cam-tbs) para la evaluación de irritabilidad oftálmica in vitro Del mucílago de *cydonia vulgaris* var. *Oblonga* (mill) d.c. "membrillo" lima Perú 2015.
51. Celestino R., Llacsa Q. "Evaluación de la irritabilidad ocular in vitro mediante el método HET-CAM en cremas para contorno de ojos con y sin registro sanitario que se comercializan en el distrito de la victoria, la parada - lima." Lima Perú 2018.
52. Mendoza D., Saavedra A. "Composición química y capacidad anti-irritante de extractos de cuerpo entero de ulomoides dermestoides (coleoptera, tenebrionidae)". Lima Perú 2013.
53. Inocente M. Toscano G, Castañeda C. Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método Het Cam. *Horizonte Medico* 2013.
54. Fernández F., González B., Gil M., Blanco M., M. Lamas D., Francisco J. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM; 2014.
55. Churampi L., Montes M. 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 (tesis para optar el grado académico de Químico Farmacéutico). UNMSM, Lima, Perú; 2015.
56. Martínez O. Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo aplicado al estudio de tensioactivos del tipo lipoaminoácido, Universidad de Barcelona, Barcelona - España 2007.
57. González M. et al Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método in vitro en sustitución de la prueba en conejos. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, ISSN 1695-7504, Vol. VII, nº 03, Marzo/2006, *Veterinaria.org*® - Comunidad Virtual

Veterinaria.org ® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual.
Disponível em <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.

58. Buitrago T. et al. Generalidades de Queratitis Micótica. rev.univ.ind.santander.salud 2013; 45 (3): 55-69
59. CORRADO, M. C. et al. Potencial tóxico de dentífricos: avaliação comparativa entre o teste de irritação da mucosa oral em hamsters e o método HET-CAM. Analytica São Paulo, v. 11, n. 61, p. 48-57, out./nov. 2012.

ANEXOS

Matriz de consistencia.

TITULO: “ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD OCULAR AGUDA DE LOS COLIRIOS DE FLUCONAZOL POR EL METODO HET-CAM ELABORADOS EN EL HOSPITAL DE EMERGENCIAS VILLA EL SALVADOR 2018.

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
<p>GENERAL: ¿Producirá toxicidad ocular aguda los colirios de fluconazol, por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de emergencias Villa el Salvador?</p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cuáles son los valores: de temperatura, humedad densidad de los huevos de gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>). 2. ¿Existe toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador? 3. Existe una concentración tóxica de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina. 	<p>GENERAL: Determinar la toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de emergencias Villa el Salvador.</p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinar los valores: de temperatura, humedad densidad de los huevos de gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>). 2. Determinar la toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador? 3. Determinar concentración tóxica de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina. 	<p>GENERAL: La toxicidad ocular aguda de los colirios de fluconazol analizadas por el método HET-CAM elaborados en el Hospital de emergencias Villa El Salvadores Baja</p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Existen valores: de temperatura, humedad densidad de los huevos de gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>). Según el protocolo HET-CAM. 2. Existen toxicidad ocular aguda en los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL por el método HET-CAM en el Hospital de emergencias Villa el Salvador? 3. Existen concentraciones tóxicas de colirio de fluconazol comparado con el colirio Nafazolina. 	<p>•Variable dependiente: Nivel de toxicidad ocular aguda.</p> <p>•Variable Independiente: Los colirios de fluconazol a las concentraciones 2mg/mL 4 mg/mL 6 mg/mL 8 mg/mL.</p>	<p>ENFOQUE: cuantitativo</p> <p>DISEÑO: experimental</p> <p>TIPO: experimental</p> <p>POBLACIÓN: colirios a base de fluconazol.</p> <p>MUESTRA: 4 colirios elaborados a base de fluconazol:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 01 colirio elaborados a 2mg /mL de fluconazol. • 01 colirio elaborados a 4mg /mL de fluconazol. • 01 colirio elaborados a 6mg /mL de fluconazol. • 01 colirio elaborados a 8mg /mL de fluconazol. <p>TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Fichas de observación. - Método HET-CAM. -Procesamiento de datos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Resumen de procesamiento de casos

	Válido		Casos Perdido		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Indice de Irritabilidad * Concentraci3n de los colirios de fluconazol	60	100,0%	0	0,0%	60	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significaci3n asint3tica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	120,000 ^a	9	,000
Raz3n de verosimilitud	124,766	9	,000
Asociaci3n lineal por lineal	52,157	1	,000
N de casos v3lidos	60		

a. 12 casillas (75.0%) han esperado un recuento menor que 5.
El recuento m3nimo esperado es .50.

Tabla cruzada Indice de Irritabilidad*Concentracion de los colirios de fluconazol

			Concentracion de los colirios de fluconazol				Total
			2mg/ml	4mg/ml	6mg/ml	8mg/ml	
Indice de Irritabilidad	No Irritante	Recuento	15	15	0	0	30
		% dentro de Concentracion de los colirios de fluconazol	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	50,0%
	Irritante Leve	Recuento	0	0	2	0	2
		% dentro de Concentracion de los colirios de fluconazol	0,0%	0,0%	13,3%	0,0%	3,3%
	Irritante Moderado	Recuento	0	0	13	0	13
		% dentro de Concentracion de los colirios de fluconazol	0,0%	0,0%	86,7%	0,0%	21,7%
	Irritante Severo	Recuento	0	0	0	15	15
		% dentro de Concentracion de los colirios de fluconazol	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	25,0%
	Total	Recuento	15	15	15	15	60
		% dentro de Concentracion de los colirios de fluconazol	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%