Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Análisis de la irritación ocular aguda del colirio elaborado de las flores de la *Cantua buxifolia Juss, ex Lam.* por el método HET-CAM

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Enrique Christian MONTÁNCHEZ MERCADO

ASESOR

Dr. Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Montánchez E. Análisis de la irritación ocular aguda del colirio elaborado de las flores de la Cantua buxifolia Juss, ex Lam. por el método HET-CAM [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica/Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Enrique Christian Montánchez Mercado
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08142968
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0067-7778
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Pablo Enrique Bonilla Rivera
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07212707
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7286-6810
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Arroyo Acevedo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06785241
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Pablo Enrique Bonilla Rivera
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07212707
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	09597625
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Oscar Herrera Calderón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	44789288
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.1.3.1. Medicina Tradicional y alternativas
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Metropolitana Distrito: La Victoria Universidad Nacional Mayor de San Marcos Av. Miguel Grau Latitud: -12.05819215 Longitud: -77.0189181894387
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Agosto 2020 - Noviembre 2022
URL de disciplinas OCDE	Toxicología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07 Farmacología, Farmacia http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **14:00 hrs. del 11 de diciembre de 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo e integrado por los siguientes miembros: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (asesor), Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa y el Dr. Oscar Herrera Calderón ; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"ANÁLISIS DE LA IRRITACIÓN OCULAR AGUDA DEL COLIRIO ELABORADO DE LAS FLORES DE LA *CANTUA BUXIFOLIA JUSS. EX LAM.* POR EL MÉTODO HET-CAM"**, presentado por el Magíster en Administración de Servicios de Salud **Enrique Christian Montánchez Mercado.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**, Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Dieciocho (18) Aprobado por unanimidad

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Administración de Servicios de Salud **Enrique Christian Montánchez Mercado** el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 15 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 15:10 hrs. del 11 de diciembre de 2023

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P. P. T.C.)
Presidente

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (P.P. T.C.)
Miembro - Asesor

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa (P. Asoc. T.P.)
Miembro

Dr. Oscar Herrera Calderón (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

.....

.....

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera, en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N°00161-FFB-UPG-2021 de la tesis, cuyo título es: **ANÁLISIS DE LA IRRITACIÓN OCULAR AGUDA DEL COLIRIO ELABORADO DE LAS FLORES DE *LA Cantua buxifolia Juss, ex Lam.* POR EL MÉTODO HET-CAM,** presentado por el **Mg. Enrique Christian Montánchez Mercado** para optar al Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Tesis, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **9%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma del Asesor

DNI: 07212707

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera



ÍNDICE

RESUMEN
ABSTRACT
INDICE DE TABLAS E INDICE DE FIGURAS **Pag.**

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 9
1.1 Objetivos de la investigación 10
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 12
2.1 Antecedentes de la investigación……...13
2.2 Aspectos Teóricos……..20
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA…….27
3.1 Tipo de investigación..... 27
3.2 Diseño metodológico 27
3.3 Unidad de análisis..... 27
3.4 Población de estudio 27
3.5 Muestra 28
3.6 Criterios de Selección 28
3.7 Técnicas o Instrumentos de recolección de la información o de datos 28
3.8 Procesamiento de la Información o de datos……46
3.9 Consideraciones éticas……..46

CAPÍTULO IV. RESULTADOS. 47
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 53
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 55
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56
CAPÍTULO VIII. ANEXOS 62

RESUMEN

Nuestro estudio utilizó el método de prueba de la membrana corioalantoidea para evaluar la irritación ocular aguda, conocido como HET-CAM, a través del estudio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam., ofreciendo una alternativa para el tratamiento de la conjuntivitis. El objetivo fue determinar a qué concentración (1, 2 3 y 4 mg/mL) de colirio de esta planta, evaluando con HET-CAM, comparando con el colirio de ciprofloxacino 3 mg/mL (estándar), solución salina NaCl al 0,9 % (control negativo) y lauril sulfato de sodio SLS al 1 % (control positivo), durante un tiempo de exposición de 300 segundos, utilizando sesenta (60) huevos fecundados. Se utilizó el método HET-CAM propuesto por Luepke según el Protocolo de la UE No. 108, ya que permitió una evaluación objetiva. Resultados: se demostró mediante el tamizaje fitoquímico, la presencia de metabolitos siendo de mayor abundancia los flavonoides. En relación a los resultados de los índices de irritación ocular según grupos distribuidos: I, IV, V, VI y IX, fueron No irritantes y los grupos II y III ligeramente irritante. El grupo VII Control Negativo y el grupo VIII Control Positivo. Concluyéndose, que las concentraciones del colirio a 1, 2 y 3 mg/ml en comparación con el colirio de Ciprofloxacina, dio lo siguiente: No irritante y la Ciprofloxacina dio como resultado: Sin irritación y ligera irritación. Teniendo en cuenta que el colirio de esta planta a 4 mg/mL tampoco es irritante. Estos resultados se correlacionaron con la abundancia de flavonoides encontrados durante la evaluación fitoquímica de sus flores.

Palabras clave: HET-CAM, irritación ocular, colirio.

ABSTRACT

Our study used the chorioallantoic membrane test method to evaluate acute ocular irritation, known as HET-CAM, through the study of Cantua buxifolia Juss, ex Lam., offering an alternative for the treatment of conjunctivitis. The objective was to determine at what concentration (1, 2, 3 and 4 mg/mL) of eye drops from this plant, evaluating with HET-CAM, comparing with ciprofloxacin eye drops 3 mg/mL (standard), 0 NaCl saline solution, 9% (negative control) and 1% sodium lauryl sulfate SLS (positive control), for an exposure time of 300 seconds, using sixty (60) fertilized eggs. The HET-CAM method proposed by Luepke according to EU Protocol No. 108 was used, as it allowed an objective evaluation. Results: the presence of metabolites, with flavonoids being the most abundant, was demonstrated through phytochemical screening. In relation to the results of the ocular irritation indices according to distributed groups: I, IV, V, VI and IX, they were non-irritant and groups II and III was slightly irritating. Group VII Negative Control and group VIII Positive Control. Concluding, that the concentrations of the eye drops at 1, 2 and 3 mg/ml compared to the Ciprofloxacin eye drops, gave the following: Non-irritant and the Ciprofloxacin resulted in: No irritation and slight irritation. Taking into account that the eye drops from this plant at 4 mg/mL are not irritating either. These results were correlated with the abundance of flavonoids found during the phytochemical evaluation of its flowers.

Key words: HET-CAM, eye irritation, eye drops.

RESUMO

Nosso estudo utilizou o método de teste da membrana corioalantóica para avaliar a irritação ocular aguda, conhecida como HET-CAM, através do estudo de Cantua buxifolia Juss, ex Lam., oferecendo uma alternativa para o tratamento da conjuntivite. O objetivo foi determinar em que concentração (1, 2, 3 e 4 mg/mL) do colírio desta planta, avaliando com HET-CAM, comparando com colírio de ciprofloxacina 3 mg/mL (padrão), solução salina 0 NaCl , 9% (controle negativo) e lauril sulfato de sódio 1% SLS (controle positivo), por tempo de exposição de 300 segundos, utilizando sessenta (60) ovos fertilizados. Foi utilizado o método HET-CAM proposto por Luepke de acordo com o Protocolo UE nº 108, pois permitiu uma avaliação objetiva. Resultados: a presença de metabólitos, sendo os flavonóides os mais abundantes, foi demonstrada através de triagem fitoquímica. Em relação aos resultados dos índices de irritação ocular segundo grupos distribuídos: I, IV, V, VI e IX, foram não irritantes e o grupos II e III foi levemente irritante. Grupo VII Controle Negativo e Grupo VIII Controle Positivo. Concluindo, que as concentrações do colírio de 1, 2 e 3 mg/ml em comparação com o colírio de Ciprofloxacina, deram o seguinte: Não irritante e a Ciprofloxacina resultou em: Sem irritação e irritação leve. Levando em consideração que o colírio desta planta a 4 mg/mL também não é irritante. Esses resultados foram correlacionados com a abundância de flavonóides encontrados durante a avaliação fitoquímica de suas flores.

Palavras-chave: HET-CAM, irritação ocular, colírio.

Índice de Tablas

Pág.

Tabla 1. Distribución de grupos para aplicación de colirios…….....43
Tabla 2. Clasificación de las Sustancias Irritantes según método HET-CAM……..45
Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam……..…….....47
Tabla 4. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam……...48
Tabla 5. Resultados de los índices de irritación ocular según grupos distribuidos…...49
Tabla 6. Análisis de la irritación ocular aguda del colirio elaborado de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, analizado por el método HET-CAM……...51
Tabla 7. Irritación ocular aguda en el colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam elaborada a las concentraciones de 1mg/mL 2 mg/mL 3 mg/mL y 4 mg/mL por el método HET-CAM…….52

Índice de Figuras

Pág.

Figura 1. Planta de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam…….....26

Figura 2. *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam acondicionada para el procedimiento de secado…….....31

Figura 3. Muestra de tallos, hojas y flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam posteriores al secado……...31

Figura 4. Extractos etanólicos de muestras de flores y hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam……...…….....32

Figura 5. Extracto etanólico concentrado de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam

……...……..33

Figura 6. Extracto etanólico concentrado de hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam

……...…..33

Figura 7. Colirios elaborados de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam……....34

Figura 8. Insumos y solutos en la campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad…….35

Figura 9. Colirios elaborados con Ciprofloxacino USP 43 (Químicamente Puro)……...36

Figura 10. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. 1) Rx. Molisch. 2) FeCl3. 3) Gelatina. 4) Rx. Shinoda. 5) Ninhidrina. 6) Dragendorff. 7) Mayer. 8) Solución muestra……37

Figura 11. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. 1) Rx. Molisch. 2) FeCl3. 3) Gelatina. 4) Rx. Shinoda. 5) Ninhidrina. 6) Dragendorff. 7) Mayer. 8) Solución madre……..38

Figura 12. Cromatografía en capa fina analítica Cl:Mt (3:1) A) 254 nm B)365nm con poca presencia de Flavonoides en Hojas……..39

Figura 13. Cromatografía en capa fina analítica Cl:Mt (3:1) A) 254 nm B)365nm-Presencia de Flavonoides en Flores…….……...…….40

Figura 14. Prueba de densidad positiva para huevo con condiciones óptimas……..…..40

Figura 15. Prueba de ovoscopía a los huevos seleccionados……..…….41

Figura 16. Incubación de huevos fértiles……...….41

Figura 17. Corte de la cámara de aire y extracción de membrana del huevo……..…..42

Figura 18. Aplicación del colirio en la membrana CAM…….……42

Figura 19. Control Negativo NaCl 0.9%.....45

Figura 20. Control Positivo (Lauril sulfato de sodio al 1%) presencia de lisis hemorragia y ligera coagulación……..45

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la conjuntivitis es la inflamación de las mucosas que recubren los párpados y la superficie del ojo. Se presentan con unas manifestaciones comunes (ojo rojo, fotofobia y lagrimeo) y otras dependiendo de su causa (ventilación matutina en casos infecciosos, adenopatías en casos virales, prurito en casos alérgicos, etc.), La duración es de 1 a 3 semanas. Por su parte, la conjuntivitis alérgica ha sido considerada como un problema de salud pública expectante alrededor del mundo y se manifiesta entre el 15 a 30% de la población mundial. Asimismo, la incidencia es aproximadamente de 6,2-38,0%. En lo que se refiere a los síntomas y signos más habituales se encuentra el enrojecimiento del ojo, fotofobia, lagrimeo intermitente, picor o escozor y asimismo, puede presentar sensación de cuerpo extraño en el interior del ojo. Esto ha sido asociado también, a la sintomatología presentada por rinitis alérgica, en relación a destilación nasal y estornudos (1).

Según la Organización Mundial de Salud, a nivel mundial, por lo menos 2200 millones de individuos han sido afectados por deficiencia visual o ceguera, de las cuales por lo menos 1000 millones de la población afectada por deficiencia visual habría tenido la posibilidad de revertir el cuadro clínico; sin embargo, el diagnóstico inoportuno en relación a la detección tardía y la falta de tratamiento han agudizado el problema (2).

Los datos proporcionados por la Organización Panamericana de la Salud evidencian que en Latinoamérica y el Caribe, por cada millón de habitantes, existen 5000 ciegos y 20 000 personas con algún grado de discapacidad visual entre ellas la conjuntivitis, cuyas causas, en el 80% de los casos son prevenibles (3).

Asimismo, los Centros para el control y prevención de enfermedades, destacan que entre las causas principales de la conjuntivitis se estima la siguiente clasificación:

- Bacterianas
- Víricas
- Alérgicas
- Por cuerpo extraño y Traumáticas.

La presente investigación está enfocada en determinar la concentración del colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam o Kantua buxifolia, conocida también como Cantuta, teniendo en cuenta que, es una especie de árbol perteneciente a la familia *Polemoniaceae* y a lo largo del tiempo desde el Incanato, a través de la medicina tradicional ha sido considerada "la flor sagrada de los incas" y flor nacional del Perú (4).

Cabe señalar que todavía faltan tratamientos efectivos disponibles en los países en desarrollo y también falta investigación científica sobre *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, a nivel local como una planta natural que puede ayudar a combatir enfermedades oculares. Por lo que, en esta investigación se identificará a través de un tamizaje fitoquímico y Cromatografía de Capa Fina en forma cualitativa, la presencia de Flavonoides, los cuales ejercen acciones: diurética, antiespasmódica y antiinflamatoria.

Expuesto anteriormente, presenta un gran reto para los farmacéuticos como alternativa natural, un colirio a base de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, para el tratamiento de patologías oculares.

Asimismo, según lo expuesto por el Ministerio de Salud, el último brote fuerte de conjuntivitis en nuestro país, data del año 2000, el cual apareció en la temporada de verano, específicamente en el mes de enero con 900 casos y en febrero con 1400 casos aproximadamente, y en este contexto, las atenciones diarias por esta patología fueron de 30 por día, causando gran alarma entre la población limeña y preocupación del personal de salud de servicios asistenciales oftalmológicos por la alta presencia de patologías como conjuntivitis y glaucoma.

También cabe señalar que en la actualidad no se comercializan colirios a base de plantas medicinales en nuestro país, y los colirios para esta enfermedad elaborados por diferentes hospitales del país según fórmula autorizada de oftalmología no se elaboran a partir de estos recursos naturales.

1.1.Objetivos de la investigación

1.1.1. Objetivo general.

Determinar a qué concentración el colirio elaborado de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex lam, presentará irritación ocular aguda, analizada mediante el método HET-CAM.

1.1.2. Objetivos específicos.

Analizar la irritación ocular aguda del colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam**,** a diferentes concentraciones por el método HET-CAM.

Evaluar la irritación ocular aguda del colirio de la *Cantua buxifolia*, Juss, ex Lam**,** comparado con el colirio de Ciprofloxacino.

Identificar a través de un estudio fitoquímico la presencia de Flavonoides en el extracto etanólico de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, que genere efecto antiinflamatorio.

Demostrar mediante un análisis TLC sobre el extracto etanólico de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, la presencia de Flavonoides en sus Flores.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Nacionales

Celestino F. et al. (2018), desarrollaron un estudio que evaluó la irritación de las cremas faciales registradas higiénicas y no higiénicas en el contorno de ojos**.** Así, aplicando el método HET-CAM, pudo determinar la irritación ocular de los productos cosméticos a la membrana corioalantoidea a niveles cualitativos y cuantitativos. En este sentido, señala que las cremas cosméticas, por su composición química, pueden causar irritación, inflamación y cáncer a largo plazo sobre todo en la piel que se encuentra en el contorno de ojos por su fragilidad, y esto ha sido comprobado por investigaciones previas causando una gran alarma a nivel mundial. Cabe señalar que las cremas que fueron incluidas en este estudio para el análisis correspondiente fueron las que contaban con registro sanitario: crema Barbaria, Cicatricure, Nivea, Ponds y Portugal. Para los no registrados se analizó baba de caracol, conchas de perlas, escaramujos, sábila o aloe vera vendidos en el distrito de la Victoria de Lima. Para ello se utilizó solución salina como control negativo y lauril sulfato como control positivo y se clasificó como irritante moderado, hidróxido de sodio con clasificación de irritante severo y etanol y propilenglicol con clasificación de irritante leve. En sus resultados, encontraron que, para las cremas sin registros de higiene, los resultados de clasificación fueron muy irritantes, mientras que, para aquellas cremas con registros de higiene, encontraron que eran algo irritantes, pero más seguras. (5).

Pipa M, et al. (2015), desarrollaron una prueba in vitro con el objetivo de encontrar la irritación ocular in vitro de 04 decocciones de semillas de plantas. Señalan que utilizaron chía, linaza, membrillo y sábila; para lo cual obtuvieron los mucílagos por decocción haciendo uso de reactivos como los ácidos oxálicos y tánicos; asimismo acetatos de plomo básico y neutro adicionando alcohol al 96% para su identificación; en concentraciones del 1 %, 10 % y 100 %, en comparación secuencial con el control positivo 02 (LSS al 1 %, NaOH 0,1 N) y el control negativo con NaCl al 0,9 %; comprobando la irritación ocular de cada uno. Para el método HET-CAM, utilizaron el corion alantoideo de huevos fértiles de la

variedad roca blanca, los cuales fueron incubados durante diez días, transcurrido el cual comenzaron a cubrirse de mucosidad y posteriormente observaron irritación por observación estereoscópica. Concluyen en que, por el método Het-Cam a las diferentes concentraciones pre establecidas, las cuatro especies analizadas, no poseen efecto irritante a nivel ocular (6).

Eulogio J, et al. (2015), realizaron un estudio para evaluar la irritación ocular in vitro de *Cydonia vulgaris* var. Oblonga (mill) D.C. conocida comúnmente como membrillo para lo cual aplicaron la prueba CAM-TBS. Cabe resaltar que el mucilago fue extraído de las semillas secas por procesos de decocción y usaron los ácidos oxálicos y tánicos; asimismo acetatos de plomo básico y neutro adicionando alcohol al 96% para su identificación. Las evaluaciones se aplicaron a 1, 10 y 100% de concentración de mucilago haciendo a su vez cotejos con 02 controles positivos (lauril sulfato de sodio al 1 % y NaOH 0,1N) y con uno negativo de cloruro de sodio 0,9 %. Por su parte, para la evaluación del perjuicio a nivel tisular utilizaron espectrofotometría para medir la impregnación del colorante Azul de Tripán en la membrana corioalantoidea en huevos de pollo con diez días de incubación artificial, utilizando la prueba de CAM-TBS con la finalidad de diferenciar las células vivas de las sucumbidas. Señalando que, dentro de los resultados encontraron que a todas las concentraciones especificadas en relación a controles positivos fueron no irritantes y en relación a los controles negativos fueron moderadamente irritantes. Concluyendo que, a través del método CAM-TBS, el mucilaje a las concentraciones pre establecidas, no es irritante (7).

Quintana C, Hornes J. (2018), el objetivo fue medir los efectos antiinflamatorios de extractos hidroalcohólicos de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, sobre edema plantar en ratas albinas, identificar metabolitos secundarios, concentraciones óptimas y comparar sus efectos con ibuprofeno. Para este estudio se utilizó 1 kg de flores con su respectiva identificación taxonómica y 80 ratas albinas Holtzman. Señalan que, sometieron las flores a los procesos de desecación y pulverización para posteriormente obtener los extractos por maceración a los que se aplicó etanol al 96%. Cabe señalar que, utilizaron las reacciones de Dragendorff , Mayer, y Wagner para determinar alcaloides; Ensayo de Shinoda, para flavonoides; Prueba de la Espuma para saponinas; Ensayo de cloruro férrico

para compuestos fenólicos, Reacción de Molish para glicósidos; Reacción de Bontrager para quinonas: Reacción de Ninhidrina para aminoácidos; Reacción de Gelatina-sal para taninos; Cromatografía en capa fina para identificar metabolitos; Dosis Letal 50 (DL50) para toxicidad aguda; Para la evaluación del efecto antiinflamatorio utilizaron el método de Winter empleando como estándar Ibuprofeno de 800 mg. En sus resultados obtuvieron que el extracto, presenta metabolitos secundarios (Flavonoides) con una concentración óptima para la acción antiinflamatoria, teniendo una acción antiinflamatoria similar a la del ibuprofeno. Se concluyó que 1000 mg/kg del extracto hidroalcohólico tuvieron un efecto antiinflamatorio sobre el edema subplantar. (8).

Sánchez M. (2019), realizo un estudio para determinar el efecto antiinflamatorio de un extracto hidroalcohólico de flores de *Cantua buxifolia* en ratas albinas. El autor señala que, el método utilizado para determinar irritación fue el de edema subplantar con un pletismómetro digital; para lo cual tomó en cuenta un grupo blanco aplicando solo carragenina, para el grupo control diclofenaco y para el experimental los extractos de *Cantua buxifolia* al 1% y 2%.

En los resultados se encontró que el porcentaje de inflamación del grupo estándar fue 16.32% en la primera hora, 13.15% en el experimento 1% y 8.18% en el experimento 2%, el grupo estándar fue 8.79% en la tercera hora, 9,39% en el experimento 1%, y 5% en el experimento 2%, grupo estándar 1,67% en la quinta hora, 5,63% en el experimento 1%, 2,73% en el experimento 2%. Se comprobó el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de la flor y se concluyó que a una concentración del 2% se alcanzaba el efecto máximo entre 1 y 3 horas. (9).

Taype E. (2015), realizó un estudio para estandarizar y validar una prueba de irritación ocular in vitro utilizando métodos cualitativos y cuantitativos HET-CAM. (CAM-TBS), en extractos de *Physalis peruviana* L, *Myrciaria dubia* L, *Mauritia flexuosa* L, *Solanum sessiliflorum* D., y *Passiflora mollisima* HBK Destacamos que el método HET-CAM ha surgido como una alternativa a la prueba de Draize en extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicólicos de las especies estudiadas. Asimismo, sugirió que, según el método HET-CAM, para determinar la irritación o toxicidad de los extractos obtenidos por el método de la membrana corioalantoidea teñida con azul de tripano (CAM-TBS), es suficiente

un tiempo de exposición de 5 minutos. La validación del método, por otro lado, verifica la linealidad, la precisión, repetibilidad, reproducibilidad, la robustez y la exactitud. Los resultados mostraron que los extractos acuosos de *Physalis peruviana* L, *Myrciaria dubia* L, *Mauritia flexuosa* L, fueron identificados como irritantes leves, extracto glicólico de *Physalis peruviana* L, extracto hidroalcohólico de *Passiflora mollisima* HBK; en cuanto a irritantes moderados identificaron a extractos hidroalcohólicos de *Myrciaria dubia* L, *Mauritia flexuosa* L y *Solanum sessiliflorum* D, extractos glicólicos de *Myrciaria dubia* L y *Passiflora mollisima* HBK; en relación a irritantes severos identificaron a extractos glicólicos de *Mauritia flexuosa* L y *Solanum sessiliflorum* D. En cuanto a la validación, la linealidad del control lauril sulfato de sodio resalta alta correlación positiva y significativa (R=0.9612), la linealidad para el control hidróxido de sodio indica alta correlación positiva y significativa (R=0.9936); En lo que se relaciona a la precisión, el valor del coeficiente de variación para repetibilidad, reproducibilidad, no fue mayor al 10%, de igual forma para robustez no fue mayor al 10%; En términos de precisión, mostraron una alta correlación positiva para los extractos acuosos de todas las especies analizadas y no hubo diferencias significativas entre concentraciones y recuperaciones. (10).

Kuch G, Carpio A. (2014), evaluó el potencial estimulante del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* ducke "Palo de rosa" en conejos albinos mediante la escala de prueba de Draize. Observó que los aceites esenciales fueron expuestos durante 1, 24, 48 y 72 horas y permanecieron expuestos durante 4 horas en el sitio de la piel del animal; señalando que las lesiones se visualizaron microscópicamente. En los resultados, no mostraron diferencia estadísticamente significativa en el cambio de peso corporal final, se registró eritema leve de grado 1 para conejos tratados con formaldehído al 98%, que aumentó a grado 3 al aumentar el tiempo de exposición; para animales tratados con vaselina, sí lo hicieron no presentaron ningún eritema en los distintos tiempos de evaluación, mientras que en los animales tratados con el aceite esencial se observó un ligero eritema grado 1 a las 24, 48 y 72 horas. Se concluyó que el índice de irritación primaria de los aceites esenciales fue de 0,21 según la escala de Draize, determinando que la irritación primaria no fue significativa. (11).

Soto M, et al. (2014), realizaron un estudio para determinar los metabolitos secundarios y los efectos antibacterianos del extracto hidroalcohólico de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. Para tal efecto; mediante la maceración con etanol de 70% de las flores obtuvieron el extracto hidroetanólico para posteriormente realizar el tamizaje fitoquímico. En sus hallazgos mencionaron como metabolitos secundarios: antocianinas, compuestos fenólicos, esteroides, flavonoides, lactonas, quinonas, saponinas, taninos y triterpenos. Asimismo, refieren que el extracto a 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL de concentración a través de la prueba de difusión en pozos se pudo apreciar in vitro actividad antibacteriana para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Concluyendo que; la concentración que obtuvo mayor inhibición fue la de 1.5mg/mL (12).

Sánchez M, Vega E. (2012), identificaron de forma preliminar metabolitos secundarios de las flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. Por lo que llevaron a cabo una marcha fitoquímica para la extracción en base al tamizaje fitoquímico denominado Prueba de la Gota con solventes como agua, agua-ácida, etanol y cloruro de metileno para posteriormente identificar metabolitos secundarios. Dentro de los resultados reportaron alcaloides, esteroides, flavonoides, leucoantocianidinas, saponinas, taninos y triterpenos en la muestra observada. Asimismo, cuantificaron los flavonoides totales en flores de *Cantua buxifolia* Juss ex Lam, también conocida como la flor sagrada de los Incas, para ello utilizaron el método de Kostennikova Z. que se fundamenta en cuantificar vía espectrofotómetro los flavonoides totales. Dentro de los resultados hallaron flavonoides en 0.5382% de concentrado, los cuales se enuncian como quercetina. Cabe señalar que los autores manifiestan que dicho hallazgo se encuentra comprendido en rangos similares a los diversos géneros que corresponden a la misma familia (13).

2.1.2. Internacionales

De Araujo L, et al., (2022), el objetivo fue comparar los protocolos francés y alemán del HET-CAM, a través de la evaluación de irritación ocular de tensioactivos, evaluando semicuantitativamente los grados de irritación en la membrana corioalantoidea en huevos de gallina. Dentro de los resultados, los autores hacen hincapié en que no encontraron diferencias significativas en los protocolos utilizados, por lo que ambos protocolos pueden ser utilizados indistintamente ya que identifican en forma precisa los grados de irritación. Señalan además que estos protocolos han sido aplicados también en conejos obteniendo resultados similares (14).

Rivero M, et al., (2021), el objetivo de esta investigación fue comparar los protocolos HET-CAM con los resultados de estudios clínicos oftalmológicos de 18 productos cosméticos en condiciones de uso para predecir irritación ocular. Para lo cual, se catalogaron cuatro niveles de irritación: no irritante, irritante débil, moderado y severo. Dentro de los hallazgos señalan que, todos aquellos productos evaluados con protocolos HET-CAM que resultaron no irritantes, también resultaron no irritantes en el estudio clínico de uso del producto; lo mismo señalan para los productos cosméticos irritantes en cuanto a protocolos HET-CAM y estudios clínicos oftalmológicos (15).

Samimi, et al., (2021), el objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de la formulación para uso oftálmico de gel en nanoemulsión de fluconazol con la prueba HET CAM. Cabe señalar que, para este caso, la toxicidad fue evaluada como el potencial de irritación de la formulación. Dentro de los hallazgos encontrados manifiestan que, según los resultados obtenidos en la prueba HET CAM, el gel in situ de nanoemulsión de fluconazol no mostró toxicidad en concentraciones de 0,1% y 0,5%. Por tanto, no provocó ninguna irritación y es bien tolerado en uso ocular (1).

Fernández A, et al. (2014), desarrollaron un estudio con la finalidad de determinar a través de la prueba HET-CAM, el efecto toxicológico de Fluconazol y Voriconazol que se elaboran en Servicios de Farmacia del Hospital de Santiago de Compostela para su uso en queratitis fúngicas. Cabe resaltar que, para

desarrollar el método se utilizaron huevos de pollos broller fecundados, por un periodo de 09 días de incubación; haciendo uso de 300 microlitros de la sustancia a testar, para Controles positivos se usó NaOH 0,1N, y para negativos NaCl 0,9%; para posteriormente observar los índices de irritación producida en los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea, los cuales fueron expuestos a la sustancia por 05 minutos a través de la prueba HET-CAM. Dentro de los resultados hallaron hemorragia a los 22 segundos, lisis a los 45 segundos y coagulación a los 67 segundos. Concluyendo que, a nivel toxicológico los colirios de Fluconazol y Voriconazol son sustancias no irritantes, por lo que su uso es apropiado para queratitis fúngica (16).

2.2. Aspectos Teóricos

La flor sagrada de los incas o flor nacional del Perú, como se le conoce popularmente es un arbusto sumamente ramificado y de aspecto muy atractivo que llega a medir entre 2 y 3 metros, sus flores se caracterizan por no poseer aroma, la variedad de colores llamativos entre ellos destacan el amarillo, blanco, rojo intenso y rosado, crecen en forma de racimos terminales de distribución tubular y cáliz corto en suelos de pH de 5.6 a 6.8, rico en materia orgánica y bien drenada, entre los 1200 y 3800 msnm, compuesta por pequeñas hojas de textura áspera, de distribución alterna y de forma lanceolada-elípticas (17,18).

Es así que, esta planta representa el patrimonio cultural del Perú, por ser considerada la flor sagrada de los Incas, además de encontrarse también como patrimonio arqueológico y especie nativa en el imaginario nacional con propiedades medicinales (19).

Al respecto, existe evidencia de que las plantas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, preexisten desde hace mucho tiempo en diferentes regiones del Perú, se distribuyen principalmente en Áncash, Apurímac, Cajamarca, Cerro de Pasco, Cuzco, Huancayo, Huánuco, Lima y Puno (20).

En relación a sus propiedades medicinales, se encuentran predominantemente las antitumorales, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas, las cuales han sido determinadas por su alto contenido de flavonoides, así como antocianinas, taninos y aceites esenciales, presentes en la flor sagrada de los incas, además de sus propiedades para paliar la diarrea, la conjuntivitis y la tos (21).

En el contexto expuesto, existe la preocupación como farmacéutico y profesional de la salud, en la elaboración de un Colirio en base a esta planta, por tener efectos benéficos para los ojos, en diferentes concentraciones; Por ello, en el Área de Farmacotecnia del Centro Médico Naval “CMST”, se han desarrollado colirios, utilizando el método de prueba de huevo-membrana corioalantoidea (HET-CAM), para brindar una nueva alternativa de tratamiento de la conjuntivitis.

2.2.1. Conjuntivitis

La conjuntivitis está relacionada a la inflamación, irritación o infección de la conjuntiva la cual está caracterizada por dilatación de los vasos conjuntivales del ojo y generalmente se producen por alergias o infecciones de tipo bacteriana en la cual se presentan secreciones purulentas o de tipo viral con secreciones acuosas (1). La transmisión de la conjuntivitis se asocia al contacto con secreciones oculares de personas infectadas y en relación a la conjuntivitis aguda, dependiendo de las diferentes épocas del año, en el verano puede afectar al 70% de la población siendo considerada como extremadamente contagiosa (23).

2.2.2. Etiología:

Infecciosas:

- Bacteriana: relacionadas con bacterias como *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus pneumoniae* y a*ureus*, *Moraxella catarrhalis*. Con menor frecuencia la *Neisseria Gonorreae* y la *Neisseria meningitidis*.
- Virus: comprende en 90% al adenovirus de doble cadena de ADN sin envoltura, enterovirus, herpes simple y virus de coxsackie.

No infecciosas:

- Alérgicas: producidas por alergenos como el polen o el polvo.
- Químicas: relacionadas a medicamentos, cloroformo y otros agentes químicos
- Asociadas a enfermedades: Se relacionan con artritis reactivas, espondilo artropatías, lupus, síndrome de Stevens- Johnson, y síndrome de Sjogren.
- Otras: comprendidos los cuerpos extraños, lentes de contacto, microtraumas, radiaciones solares (22).

La inflamación, es una de las maneras en las que el cuerpo reacciona a una infección, una lesión u otras afecciones médicas.
La inflamación puede ser aguda o crónica:

- **La inflamación aguda** dura unos pocos días y ayuda al cuerpo a recuperarse después de una infección o lesión.
- **La inflamación crónica** ocurre si la enfermedad o infección no desaparece o si el cuerpo se lesiona una y otra vez (por ejemplo, por el humo del tabaco). La inflamación crónica dura de meses a años y puede causar otros problemas médicos.

Entre los síntomas de la inflamación se incluyen los siguientes:

- enrojecimiento
- hinchazón
- dolor
- calor
- problemas para usar el área afectada

La **irritación,** es un estado inflamatorio o una reacción dolorosa del organismo causados principalmente por algún tipo de alergia a agentes químicos o a otros estímulos (por ejemplo, el calor o la luz ultravioleta).

2.2.3. Sintomatología general de la Conjuntivitis:

Dentro de los síntomas más frecuentes se encuentran enrojecimiento, fotofobia, lagrimeo, picazón, sensación de cuerpo extraño, tumefacción de párpados, en algunos casos visión borrosa. Asimismo, los principales signos son la congestión conjuntival, edema, secreción y en algunos casos adenopatías (22).

2.2.4. Complicaciones:

Dentro de las complicaciones más frecuentes se encuentran la cicatrización conjuntival, queratoconjuntivitis, ulcera corneal o corneal perforada, leucomas, queratouveitis. (22).

2.2.5. Tratamiento:

En cuanto a los tratamientos establecidos en las Guías de Práctica Clínica, para conjuntivitis alérgica encontramos que los tratamientos de elección son los antihistamínicos y estabilizadores de mastocitos; por su parte, la conjuntivitis bacteriana generalmente es tratada con colirios antibióticos (22, 23,24).

2.2.6. Colirios

Es una disolución o suspensión estéril, caracterizada como acuosa u oleosa, la cual puede contener uno o varios principios activos indicados para ser aplicados por vía ocular y se presentan en forma de emulsiones, soluciones o suspensiones. Por su parte, la anatomía, fisiología y bioquímica del ojo, exige que sustancias como los colirios, no causen daño a los tejidos, sobre todo aquellos que contienen algún tipo de preservante o agente conservante como agentes quelantes (EDTA), amonio cuaternario (cloruro de benzalconio), biguanidas (clorhexidina) y mercuriales (timerosal), que pueden dañar considerablemente la córnea que se considera el principal elemento de refracción del ojo. Asimismo, en relación a preparados galénicos de estos productos se hace especial énfasis en que deben de cumplir con 04 condiciones fundamentales: esterilidad, osmolaridad pH, y transparencia y se prepararán empleando técnicas asépticas en campana de flujo laminar (25).

En relación a la esterilidad, es considerado como uno de los requisitos más importantes y se emplean los métodos de filtración esterilizante, esterilización por calor seco, esterilización por vapor; en lo que se refiere al pH, los colirios deben tener uno cercano a la neutralidad del ojo; y en relación a la transparencia, estar libres de partículas (26).
Cabe resaltar que, la Farmacopea USP 43 del año 2020, establece las normas para la determinación del pH, osmolaridad y esterilidad de preparaciones magistrales de uso oftálmico (27).
En tal sentido, se infiere que las soluciones oftálmicas de NaCl 0,6 – 2 % son fácilmente toleradas por el ojo y de rápida dilución por poseer la lágrima un pH aproximado de 7.4.

2.2.7. La importancia de las pruebas de toxicidad ocular

En relación a la importancia de los ensayos de toxicidad ocular, se tiene que, desde la década de los años 1930, en Estados Unidos, se presenció un incidente en el que una mujer perdió la vista debido al uso de un producto cosmético aplicado en las pestañas que contenía p-fenilendiamina en su composición debido a blefaritis alérgica, queratoconjuntivitis y queratitis bacteriana secundaria. (28).

En este sentido, Estados Unidos decreta a través de una Ley Federal, que todos los productos cosméticos deben de incluir estudios de irritación dérmica y ocular

anticipadamente a ser lanzados para su comercialización, con el fin de evitar que causen daños a los usuarios de ese tipo de productos, resaltando que son los profesionales químicos farmacéuticos los encargados de llevar a cabo los mencionados análisis por ser parte de sus competencias profesionales. Es así que, entrada la década de los 1940, la FDA incide en el desarrollo de los estudios de toxicología dérmica y ocular; en este aspecto, el Dr. John Draize, fue pionero en el desarrollo de técnicas para evaluar la seguridad de los cosméticos y analizar sus efectos que podrían afectar la piel y los ojos. Teniendo en cuenta que poco a poco se fue implementando el protocolo en las industrias farmacéuticas. (29).

En este sentido, el método de membrana corioalantoidea de embrión de pollo (HET-CAM) se considera como uno de los ensayos in vitro que puede sustituir al método de Draize para el análisis de productos toxicológicos y farmacológicos como los colirios. (30, 31).

Por su parte, la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico, conocida como OCDE, a través de las Buenas prácticas de laboratorio, avala métodos alternativos a las pruebas en animales, se considera que estos métodos y técnicas evalúan la alergia cutánea y la irritación ocular tanto para predecir la posibilidad de alergia como para detectar la posibilidad de irritación ocular por los productos químicos utilizados en los cosméticos, protegiendo así la seguridad del consumidor al evitar efectos adversos. (32).

2.2.8. Draize de irritación ocular

La prueba o análisis de Draize, consiste en colocar una dosis fija de una sustancia química en un ojo de un conejo para estudiarlo y en el otro ojo como control. Esta prueba permite evaluar los efectos adversos producidos en la conjuntiva, la córnea o el iris de los ojos de los animales, especialmente de los conejos, destacando que los daños en la córnea son más nocivos si se identifican como sustancias irritantes o corrosivas. El nivel o extensión de la inflamación o irritación se puntuó 21 días después de la exposición a la sustancia.

Cabe resaltar que esta prueba ha sido muy criticada tanto por la subjetividad de observaciones, por la incertidumbre de resultados y por el gran número de animales que se utilizaron para establecer la irritación ocular de cosméticos. Es en este sentido, que se han desarrollado las pruebas in vitro como métodos alternativos para limitar el uso de animales en la predicción de la seguridad de una sustancia para uso cosmético (33).

2.2.9. Método HET – CAM

En la búsqueda de metodología alternativa que eliminara los experimentos con animales, se desarrollan la prueba del huevo de gallina sobre la membrana corioalantoidea, denominada (HET-CAM). Esta prueba es una técnica in vitro, tiene la finalidad de evaluar las propiedades irritantes para los ojos, de formulaciones cosméticas; para lo cual se utilizan huevos fértiles de 09 días, ya que posteriormente el embrión desarrolla el sistema nervioso. Los huevos se abrieron y las sustancias a estudiar se aplicaron directamente sobre la membrana corioalantoidea (CAM) y se observaron microscópicamente para comprobar que no coagulaban, sangraban ni contraían los vasos sanguíneos. La clasificación toma los siguientes valores: De 0 a 0.9 puntos no irritante; de 1 a 4.9 puntos ligeramente irritante; de 5 a 8.9 puntos Irritante moderado y de 9 a 21 puntos muy irritante. Cabe resaltar que, este método ha obtenido la validación con un promedio de cien productos de la industria cosmética por lo que se le considera de buena estimación del potencial de irritación (34).

2.2.10. Validación del Método HET – CAM

El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos ha validado el método HET-CAM y la tecnología de medición de la irritación ocular, demostrando que puede reemplazar a Draize. (35).

Asimismo, por su alta capacidad predictiva ha recibido la aceptación y aprobación en varios países para ser desarrollada en los laboratorios cosméticos, según lo expuesto por Balls et al. (36).

2.2.11. *Cantua buxifolia* Juss ex Lam

2.2.12. Taxonomía de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

Para obtener la clasificación de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, se utilizaron los servicios del biólogo José Ricardo Campos de la Cruz, obteniendo dos clasificaciones, una según la base de Trópicos que sigue la clasificación de los grupos de filogenia de las

angiospermas (APG), sistema de clasificación moderno para angiospermas fue publicado por Angiosperm Phylogenetic Group en 1988 y revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), por otro lado, Angiosperm Integrated Taxonomy de Arthur Cronquist, et. al (1981) elaborado de la siguiente manera:

Clasificación Sistema APG-2016:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnolidae

Orden: Ericaceae

Familia: Polemoniaceae

Género: Cantua.

Especie: *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

Clasificación Sistema de Cronquist 1981:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Polemoniaceae

Género: Cantua.

Especie: *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

Cabe señalar que la taxonomía APG-2016 coincide con el informe de análisis de la misma muestra vegetal realizado por la Dra. Joaquina A. Albán Castillo del Museo de Historia Natural.

Asimismo, se le conoce con los siguientes nombres: flor sagrada de los incas, flor de cantuta, ccantu, ccantutay, jantu, khantuta y cabe señalar que su periodo de floración es de agosto a diciembre (9).



Figura 1. Planta de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam

2.2.13. Uso medicinal

Desde épocas ancestrales, los pobladores peruanos han utilizado la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam para el tratamiento de inflamación y tos (9).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Observacional longitudinal, porque en este estudio pudimos recolectar datos sobre los niveles de irritación aguda por observación directa de las membranas asociadas a colirios elaborados con diferentes concentraciones a base de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam., durante un periodo de tiempo y registrar el desarrollo de los resultados.

3.2. Diseño metodológico

El estudio fue de diseño experimental in vitro, y se realizó en las instalaciones del Centro Médico Naval "CMST" en el Área de Farmacotecnia. El Diseño utilizado fue la investigación experimental, que 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.

En este estudio experimental in vitro, se buscó calcular el índice de irritación (Irritation Score) analizando los potenciales procesos nocivos que ocurrieron en los vasos coriónicos alantoideos de los embriones en desarrollo en los grupos experimentales y de control durante un tiempo de exposición de 300 s.

3.3. Unidad de análisis

- Huevos fértiles fecundados (*Gallus gallus domesticus*).

- Flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

3.4. Población de investigación

La composición de la población es la siguiente:

Población Biológica: Conformada por sesenta (60) Huevos fértiles fecundados (*Gallus gallus domesticus*) con peso promedio de 50 - 65 g (37).

Población Vegetal: Conformada por 1 Kg. de Flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam recolectadas en Chosica con las que se elaboró el extracto etanólico para la elaboración del colirio sujeto de estudio.

3.5. Muestra

Muestras biológicas: 27 huevos (*Gallus gallus domesticus*), que se dividieron aleatoriamente en 09 grupos, 03 unidades en cada grupo, y la actividad de estimulación se detectó por el método HET-CAM.

Muestra Vegetal: Se utilizaron 200 g. de Flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. para la preparación del extracto.

3.6. Criterios de Selección

3.6.1. Criterios de Inclusión

Los huevos fertilizados tienen un período de incubación máximo de 10 días y un peso promedio de 50 a 65 gramos. Estado intacto.

3.6.2. Criterios de Exclusión

Huevos fértiles con una incubación posterior a los 10 días.
Huevos con peso menor al establecido para la investigación

3.7 Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos

Los datos se tomaron durante y al finalizar el proceso experimental mediante observación directa y mediciones, las cuales se registraron en los formatos de las Fichas de observación de recolección de datos elaboradas por el autor para tal fin.

3.7. 1. Materiales y métodos

3.7.1.1. Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- ✓ Ovoscopio SL-PL con iluminación LED de última generación para emisión de Luz hasta 40%
- ✓ Incubadora R-COM 50 PRO Digital de Huevos con volteo automático
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Microscopio
- ✓ Cronómetro
- ✓ Cámara de Luz Ultravioleta
- ✓ Campana Extractora

Materiales

- ✓ Fiolas 100mL. con tapa de vidrio, clase B
- ✓ Mortero y pilón de Porcelana
- ✓ Pipetas de 1 y 2ml
- ✓ Pinzas quirúrgicas Kellis curvas y rectas
- ✓ Tijeras quirúrgicas metzenbauw
- ✓ Soporte para huevos (Organizador)
- ✓ Rotuladores de punta rígida
- ✓ Lunas de reloj (sódico - cálcico)
- ✓ Vaso Beaker Griffin
- ✓ Placas de Silicagel
- ✓ Piseta
- ✓ Cubeta Cromatográfica
- ✓ Capilares
- ✓ Viales
- ✓ Baguetas.

Reactivos

- ✓ Lauril sulfato de sodio al 1%
- ✓ Cloruro de sodio 0,9%
- ✓ Agua destilada estéril

- ✓ Estándar de Rutina o Quercetina
- ✓ Cloroformo
- ✓ Metanol
- ✓ Alcohol Medicinal 70º

3.7.1.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.7.1.2.1. Procedimiento para el secado de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

Muestra seca de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

Después de obtener las muestras, se secaron a temperatura ambiente durante cuatro días y luego se pesaron para producir 9,2 gramos de tallos, 2,9 gramos de hojas y 4,9 gramos de flores.

Asimismo, se llevó la muestra para secado en estufa; para lo cual se hizo uso de una estufa de aire recirculado (MEMMERT), controlando la temperatura de 40°C constante por cinco días. Posteriormente se trituraron y se sometieron por quince días a maceración etanólico agitando cada ocho horas y se almacenó la solución en frasco de vidrio ámbar. Para secado total de la muestra, se filtró tres veces la solución con papel de filtro cualitativo Whatman de grado 3 y se volvió a colocar en la estufa a 40°C. Cabe resaltar que se realizó una reducción del tamaño de partículas obteniendo pesos finales de 2.08 g de hojas y 1.96 g de flores. (38).



Figura 2. *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam acondicionada para el procedimiento de secado



Figura 3. Muestra de tallos, hojas y flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam posteriores al secado

3.7.1.2.2. Procedimiento para la elaboración del extracto

La elaboración del extracto se realizó empleando la siguiente metodología:

Se desarrollaron dos extractos por maceración tanto para las muestras de hojas como para las flores.

En relación a la muestra de hojas: 2.08 g de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam en 50 mL etanol de 70°C

En relación a la muestra de flores: 1.96 g de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam en 50 mL etanol de 70°C

Posterior a la obtención de ambos extractos se maceraron por quince días, con agitación de tres veces al día por siete días.

Luego se filtraron dos veces de forma independiente, obteniendo 40 mL para las hojas y 42 ml para las flores.

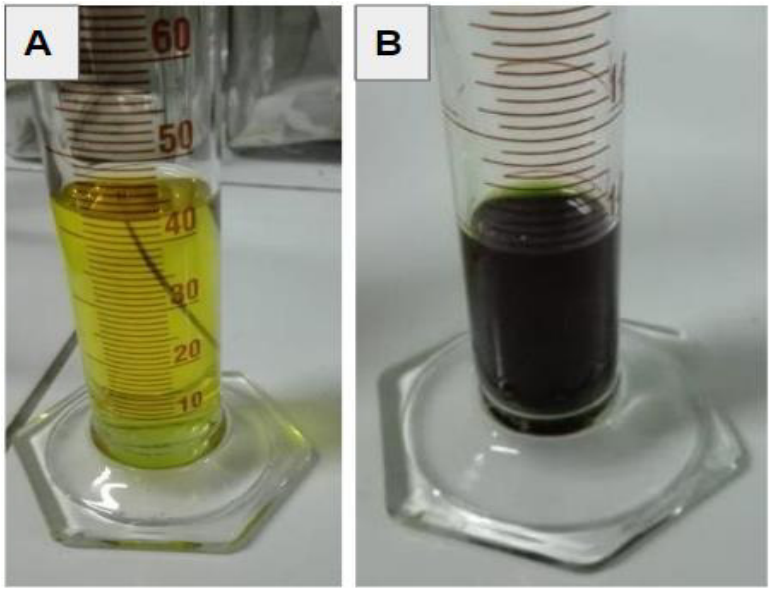


Figura 4. Extracto etanólico de muestras de flores y hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. A) Extracto de flor de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. B) Extracto de hoja de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

Cabe resaltar que, la metodología para la concentración de los extractos se realizó con el extracto filtrado, que fue llevado a estufa a temperatura constante de 40°C posterior a ser colocado en recipiente de vidrio templado para evaporar los solventes y lograr la concentración, obteniendo extracto seco de 1.02 g par hojas y 0.84 g para flores.



Figura 5. Extracto etanólico concentrado de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam

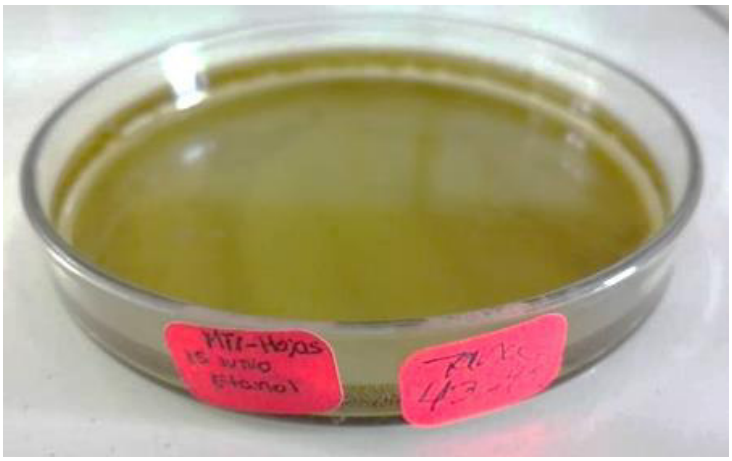


Figura 6. Extracto etanólico concentrado de hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam



Figura 7. Colirios elaborados de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam

3.7.1.2.3 Determinación de pH, osmolaridad y esterilidad

Las pruebas y ensayos aplicados fueron los establecidos en la Farmacopea USP 43, utilizando fórmula patrón.

Los materiales y equipos que se utilizaron fueron los siguientes:

Balanza Analítica de nivel Estándar

Agitador mecánico multipruebas

Vasos de precipitados y probetas.

Autoclave Tipo N Energy

Campana de flujo laminar vertical Modelo CFV Marca Tecnolab

Campana Extractora Protector LABCONCO

Equipo para esterilización adecuado a las características de la preparación 3M

Para las flores se aplicó el siguiente método:

Se pesó y midió la materia prima, realizando la limpieza de las flores con Hipoclorito de Sodio al 1%, ¾ partes de solvente junto al principio activo se agitaron hasta disolución, los vehículos más usados son agua para inyección y suero salino isotónico estéril.

Se procedió a la filtración del residuo de las flores para proceder a determinar el índice de pH y ajustarlo según necesidad, considerando que el pH más tolerado oscila entre 6.6 a 7.8 ya que se asemeja al de las lágrimas, aunque pH entre 3.5 a 10.5 se consideran con buena tolerancia por la capacidad de amortiguación lacrimal. Cabe resaltar que se utiliza tampón fosfato Na2 HPO4 /NaH2 PO4, para mantener el pH en 7.4.

Para aumentar la velocidad de disolución del principio activo se aplica calor verificando que este no afecte su estabilidad. En caso de principio activo insoluble se incorpora previamente disuelto en un cosolvente de polaridad adecuada y tolerable por el globo ocular.

Se utilizó NaCl al 0,9% como agente isotónico debido a su equivalencia y compatibilidad con las lágrimas naturales; se añadió lentamente Cloruro de Benzalconio como conservante y se completó con el resto del solvente hasta el volumen total especificado en la fórmula para proceder a calcular las concentraciones establecidas. Se esterilizó mediante autoclave por 180 segundos.

En relación a los controles y estudios de estabilidad, se aplicaron los establecidos en la Farmacopea USP 43 y para los controles microbiológicos se utilizó la cabina de flujo laminar vertical por 5 minutos para asegurar la esterilidad.



Figura 8. Insumos y solutos en la campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad

3.7.1.2.4 Procedimiento para la elaboración del colirio de Ciprofloxacino

Se utilizó Ciprofloxacino USP 43 (Químicamente Puro) y se elaboró según los parámetros de la USP 43, las materias primas se adquirieron en una droguería de Lima en su presentación como genérico, aplicando el mismo procedimiento de preparación, del Colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam. Asimismo, se envasó en frasco de vidrio ámbar y se colocó etiqueta en el frasco, una vez abierto solo se podrá utilizar dentro de las cuatro semanas siguientes.

La técnica utilizada para el análisis HET-CAM de la irritación ocular está descrita en el Protocolo INVITTOX Nº 108, ya que clasifica adecuadamente las sustancias con buena sensibilidad, especificidad y previsibilidad.



Figura 9. Colirios elaborados con Ciprofloxacino USP 43 (Químicamente Puro)

3.7.1.2.5. Estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam

Se aplicó un estudio fitoquímico a extractos de hojas y flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam y el método se describe a continuación.

Se realizó una marcha fitoquímica de los principales reactivos para determinar presencia de metabolitos en el extracto de hojas y flores, para lo cual se colocó 1 mL de agua destilada con 0.12 gramos de extracto adicionándole 1 mL de reactivo, para posteriormente someterlos a la identificación de metabolitos secundarios mediante las siguientes reacciones de coloración y precipitación. (38).

Determinación de alcaloides

Prueba de reactivo de Dragendorff: se colocó el extracto en un tubo de ensayo, se agregó el reactivo de Dragendorff, es positivo si da color naranja a rojo.

Prueba del reactivo de Mayer: se colocó el extracto en un tubo de ensayo, se agregó el reactivo de Mayer y se observó el precipitado blanco en el fondo del tubo como positivo.

Prueba del Reactivo de Molish: se tomó 1mL del extracto y se colocó en un tubo de ensayo, se agregó el reactivo de Molish, observando cuando el azúcar tiene un anillo morado, es positivo.

Prueba del reactivo de Ninhidrina: se tomó 1 mL de extracto y se colocó en un tubo de ensayo, se agregó el reactivo de ninhidrina, si se vuelve azul púrpura, es positivo para aminoácido.

Determinación de compuestos fenólicos

Prueba de Cloruro férrico: En un tubo de ensayo se colocó el extracto y se adicionó tres gotas de Cloruro férrico al 10%, la prueba es positiva cuando vira a color verde o azulado.

Determinación de Flavonoides

Prueba Shinoda, se realizó en un tubo de ensayo colocando 1 mL de muestra y después se añadió limadura de Magnesio y 3 gotas de HCl concentrado. Si la coloración se vuelve naranja confirma la presencia de flavonoides.

Determinación de Taninos

Prueba de gelatina de cloruro de sodio: se colocó 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, se agregó tres gotas de gelatina de cloruro de sodio y se observó un precipitado blanco como positivo.

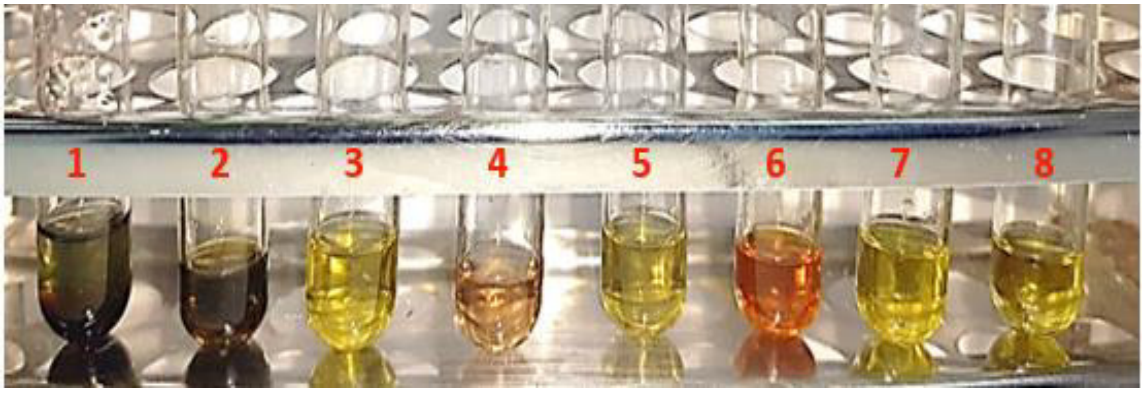


Figura 10. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de hojas de *Cantua buxifolia Juss, ex Lam*. 1) Rx. Molisch. 2) $FeCl_3$. 3) Gelatina. 4) Rx. Shinoda. 5) Ninhidrina. 6) Dragendorff. 7) Mayer. 8) Solución muestra.

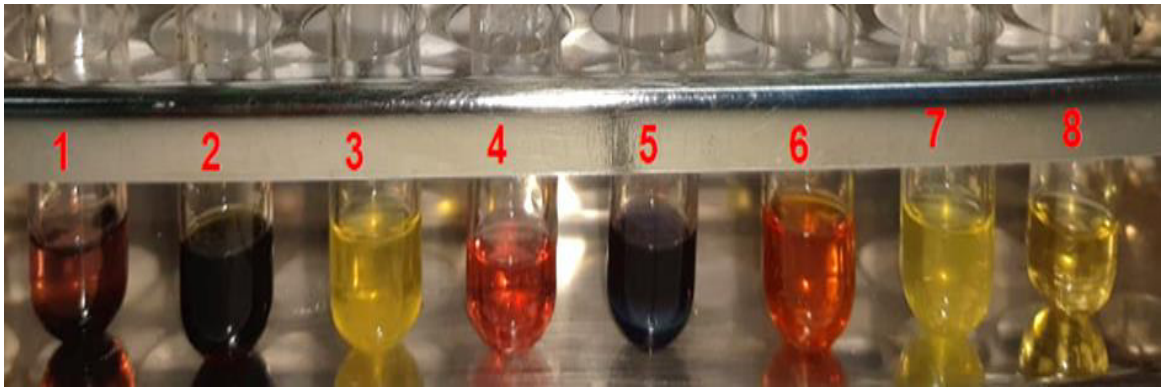
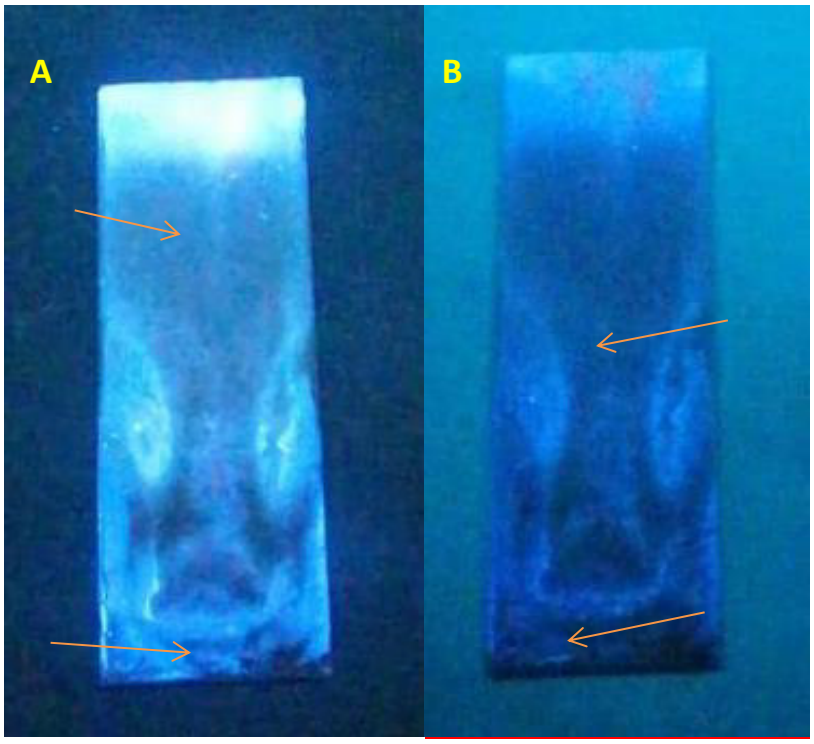


Figura 11. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de flores de *Cantua buxifolia Juss, ex Lam*. 1) Rx. Molisch. 2) $FeCl_3$. 3) Gelatina. 4) Rx. Shinoda. 5) Ninhidrina. 6) Dragendorff. 7) Mayer. 8) Solución madre.

3.7.1.2.6. Cromatografía analítica

Se aplicó TLC a extractos de hojas y flores de *Cantua buxifolia*, ex Lam, como sigue. Para las hojas se realizó cromatografía analítica en capa fina del extracto etanólico de las hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, para lo cual se inocularon muestras y estándares 20 veces con capilares en placas cromatográficas de gel de sílice G y se prepararon las placas cromatográficas. Cloroformo: sistema solvente de metanol.

Las placas cromatográficas se revelaron bajo lámparas UV a 254 nm y 365 nm.
Solución estándar: 10 µl de rutina o quercetina (arándano)
Fase móvil: Cloroformo: Metanol (3:1)
Fase estacionaria: Las cromatoplacas 2.5*7.5 cm, fueron activadas a temperatura de 120 º C, durante 30 minutos placa de sílica gel.



Estándar **Muestra (Hojas)**

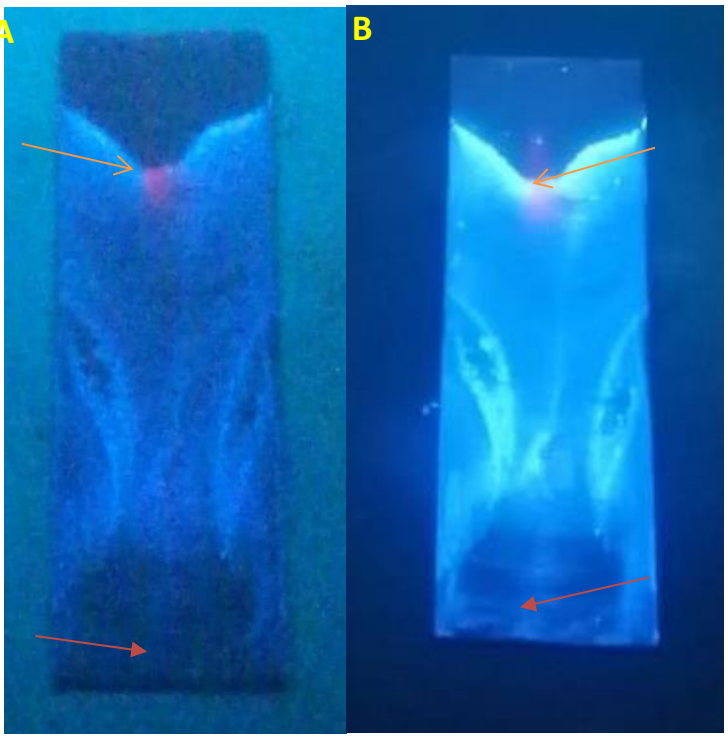
Figura 12. Cromatografía en capa fina analítica Cl:Mt (3:1) A) 254 nm B)365nm-Poca o nada presencia de Flavonoides en Hojas

Para las flores, se realizó un análisis TLC analítico sobre extractos etanólicos de *Cantua buxifolia* Juss, flores ex Lam, para lo cual las muestras y los estándares se sembraron capilarmente 20 veces en placas de cromatografía de gel de sílice G y se prepararon las placas. Utilice un sistema disolvente de cloroformo: metanol. Se reveló la cromatoplaca en la lámpara de luz UV a 254 nm y 365 nm.

Solución estándar: 10 µl de rutina o quercetina (Arándanos)

Fase móvil: Cloroformo:metanol (3:1)

Fase estacionaria: Las cromatoplacas 2.5*7.5 cm, fueron activadas a temperatura de 120 º C, durante 30 minutos placa de sílica gel.



Estándar **Muestra (Flores)**

Figura 13. Cromatografía en capa fina analítica Cl:Mt (3:1) A) 254 nm B)365nm-Presencia de Flavonoides en Flores

3.7.1.2.7. Método HET – CAM

Primero, los huevos fertilizados se recolectaron y examinaron, y se identificó si los huevos estaban intactos mediante la prueba de densidad del agua, y se determinó la inclusión de 52 huevos que estaba en condiciones óptimas.



Figura 14. Prueba de densidad positiva para huevo con condición óptima

Asimismo, se utilizó el método diafanoscópico de ovoscopia con Ovoscopio SL-PL con iluminación LED para emisión de Luz hasta 40%, para determinar si los huevos seleccionados eran fértiles o no, con lo que se confirmó que los 52 huevos seleccionados eran fértiles.

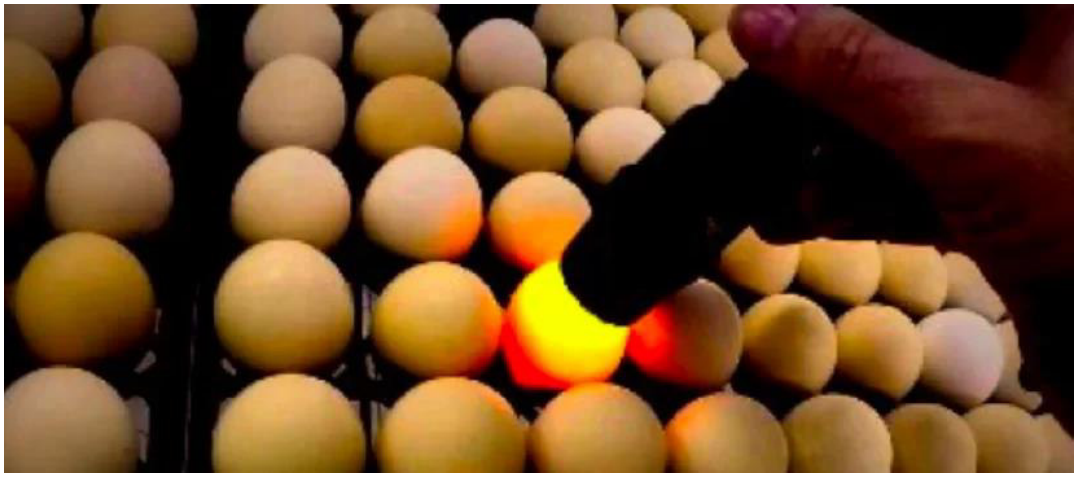


Figura 15. Prueba de ovoscopía a los huevos seleccionados

Seguidamente se llevó a cabo la incubación de los huevos fértiles en Incubadora Rcom 50 PRO digital con volteo automático y control de humedad interno. Se realizó el volteo automático a partir del día 03 y se programó volteo automático cada 04 horas, con humedad relativa entre 55 y 65 y temperatura de 37.8 °C.



Figura 16. Incubación de huevos fértiles

En este sentido, aplicando la técnica CAM se procedió a abrir el huevo recortándole la cáscara en forma de circulo a nivel de la cámara de aire, para seguidamente extraer la membrana blanquecina con ayuda de unas pinzas, cabe resaltar que esta ha sido previamente humectada con suero fisiológico para dejar expuesta la membrana corioalantoidea que viene a representar el ojo de una persona por ser sumamente irrigada y vascularizada.

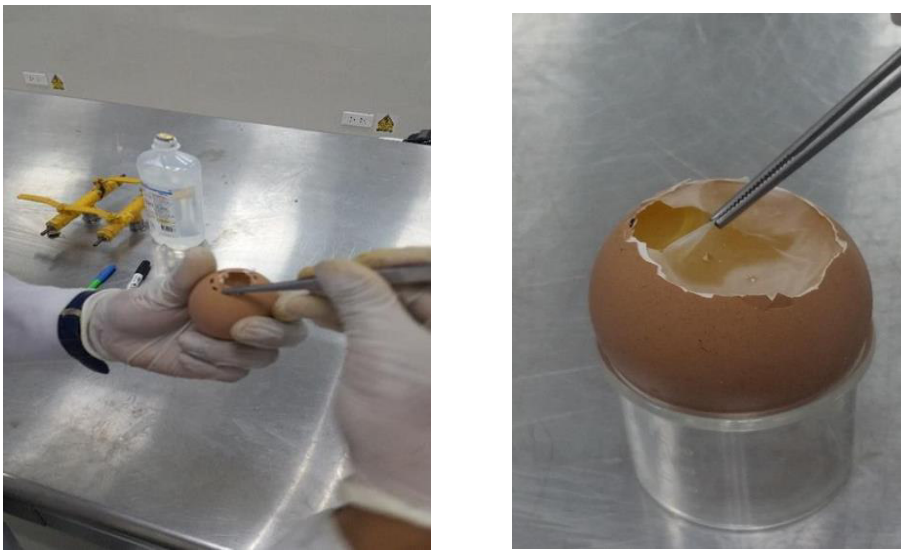


Figura 17. Corte de la cámara de aire y extracción de membrana del huevo

Se sometió la membrana corioalantoidea a Solución Salina, al Lauril sulfato de sodio y formulación (Colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL y 4 mg/mL), se pipeteo 0,3 ml de producto sobre membrana CAM, y se analizó durante

20 segundos. Luego se continuó lavando con agua destilada durante 300 segundos y se continuó con el registro del tiempo y la intensidad del fenómeno.

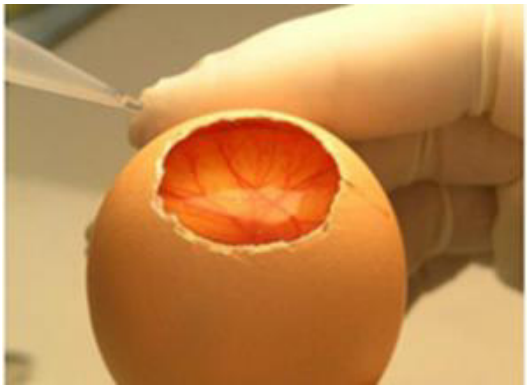


Figura 18. Aplicación del colirio en la membrana CAM

Para calcular el índice de irritación ocular, se debe estimar el tiempo hasta la coagulación, el sangrado o la vasoconstricción utilizando la siguiente formula:

$$IIO = \frac{(301 - h)x5}{300} + \frac{(301 - v)x7}{300} + \frac{(301 - c)x9}{300}$$

En la formula aplicada, las letras h, v y c conciernen a los tiempos expresados en segundos, en relación a la aparición de hemorragia, vasoconstricción y coagulación.

En este sentido, las observaciones se basan en que para hemorragia se visualiza sangre extravasada, para vasoconstricción los capilares se tornan más finos y más claros y para coagulación se visualiza opacidad y/o trombosis.

Tabla 1. Distribución de grupos para aplicación de colirios

Grupo	N° de ensayos HET-CAM	Sustancia	Concentración	Observación a realizar
Grupo I	03	Colirio de Ciprofloxacino	1 mg/mL (Estándar)	Coagulación (desnaturalización de proteínas intravasculares y extravasculares), hemorragia y lisis (ruptura vascular)
Grupo II	03	Colirio de Ciprofloxacino	2 mg/mL (Estándar)	Coagulación (desnaturalización de proteínas intravasculares y extravasculares), hemorragia y lisis (ruptura vascular)
Grupo III	03	Colirio de Ciprofloxacino	3 mg/mL (Estándar)	Coagulación (desnaturalización de proteínas intravasculares y extravasculares), hemorragia y lisis (ruptura vascular)
Grupo IV	03	Colirio de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam	1 mg/mL (Muestra a estudiar)	Coagulación (desnaturalización de proteínas intravasculares y extravasculares), hemorragia y lisis (ruptura vascular)
Grupo V	03	Colirio de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam	2 mg/mL (Muestra a estudiar)	Coagulación (desnaturalización de proteínas intravasculares y extravasculares), hemorragia y lisis (ruptura vascular)
Grupo VI	03	Colirio de *Cantua buxifolia*	3 mg/mL (Muestra a	Coagulación (desnaturalización de

		Juss, ex Lam	estudiar)	proteínas intravasculares y extravasculares), hemorragia y lisis (ruptura vascular)
Grupo VII	03 Control negativo	Suero Fisiológico NaCl 0,9%.	-	Control negativo no estimulante
Grupo VIII	03 de control positivo	Lauril Sulfato de Sodio - SLS 1%.	-	Control positivo Irritante
Grupo IX	03	Colirios de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam	4 mg/mL (Muestra a estudiar)	Observar signos de irritación aguda y considerar sino lo hubiera como dosis máxima tolerada y si lo hubiera como irritación toxica severa para no recomendar su uso a dicha concentración

Nota, para el Grupo VII del control negativo: La solución salina fisiológica es una sustancia con un valor de pH neutro y no producirá reacciones tóxicas e irritantes para la membrana alantoidea coriónica. El resultado es una sustancia no irritante.

Así mismo para el Grupo VIII del control positivo: Lauril Sulfato de Sodio, utilizado como detergente en la industria por su tensoactivo iónico, y utilizado como positivo en el método HET-CAM por su control irritante.



Figura 19. Control negativo NaCl 0,9%

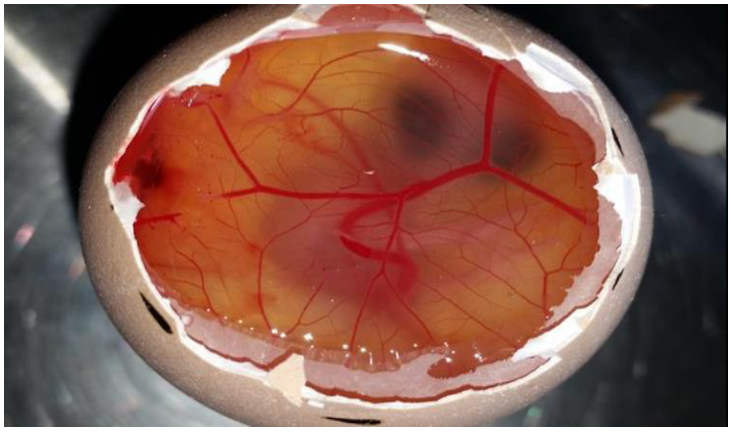


Figura 20. Control Positivo (Lauril sulfato de sodio al 1%) presencia de lisis hemorragia y ligera coagulación

Tabla 2. Clasificación de sustancias irritantes según el método HET-CAM

IIO	Clasificación
0 a 0.9	No irritante
1 a 4.9	Ligeramente irritante
5 a 8.9	Irritante
9 a 21	Muy irritante

3.8. Procesamiento de la información o de datos

El análisis y procesamiento de los datos se presentó a través de gráficos, por lo que los resultados obtenidos de las tablas de registro se ingresaron en los programas SPSS versión 26.0 Windows y Microsoft Excel 2019. Para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos de medición se aplicó la prueba t de Student y el estadístico chi-cuadrado.

3.9. Consideraciones éticas

Debido a la crueldad de estos métodos con animales, muchos investigadores rechazan las pruebas in vivo en favor de las pruebas in vitro, que se correlacionan mejor con los resultados humanos que las pruebas con animales, evitando así la exposición innecesaria a irritantes. Sobre experimentos con animales, el uso de animales en el proceso de descripción es controvertido debido a la falta de potencial para expresar el sufrimiento, por lo que se prioriza la calidad ética del investigador científico. La irritación ocular

causada por diferentes sustancias se evaluó en este estudio mediante el método HET-CAM. Este método es más eficiente por su rapidez, sencillez y sensibilidad. (39, 40).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Resultados:

4.1.1. Resultados del estudio fitoquímico

En el estudio fitoquímico preliminar se determinó presencia de metabolitos secundarios en el extracto de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, en el que se puede evidenciar existencia de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y taninos

Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de hojas de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam.

Metabolito secundario	Reactivo	Ensayo	Observación
Alcaloides	**Dragendorff**	**+**	**Precipitado rojo ladrillo**
Alcaloides	**Mayer**	**+**	**Precipitado blanco**
Carbohidrato	**Molisch**	**++**	**Anillo violeta**
Aminoácidos	**Ninhidrina**	**-**	**Azul Violeta**
Compuestos fenólicos	**$FeCl_3$**	**++**	**Coloración verde oscuro**
Flavonoides	**Shinoda**	**+**	**Leve coloración rojiza**
Taninos	**Gelatina**	**+**	**Nubosidad**

Leyenda: (+++) Abundante; (++) Regular; (+) Poco; (-) Ausente

Fuente. Elaboración propia, enero de 2023.

Tabla 4. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam

Metabolito secundario	Reactivo	Ensayo	Observación
Alcaloides	**Dragendorff**	**++**	**Precipitado rojo ladrillo**
Alcaloides	**Mayer**	**+**	**Poco precipitado blanco**
Carbohidrato	**Molisch**	**++**	**Anillo violeta**
Aminoácidos	**Ninhidrina**	**++**	**Coloración violeta**
Compuestos fenólicos	**$FeCl_3$**	**++**	**Coloración verde oscuro**
Flavonoides	**Shinoda**	**+++**	**Coloración rojiza**
Taninos	**Gelatina**	**++**	**Precipitado blanco**

Leyenda: (+++) Abundante; (++) Regular; (+) Poco; (-) Ausente

Fuente. Elaboración propia, enero de 2023.

4.1.2. Resultados de la Cromatografía analítica

Resultados obtenidos para las hojas aplicando la fórmula:

$$Rf = \frac{Distancia\ recorrida\ por\ el\ compuesto}{Distancia\ recorrida\ \ por\ el\ disolvente}$$

Estándar:	QUERCETINA:	5.06/5.50 = 0.92
Muestra:	HOJAS:	4.40/5.50 = 0.80

Resultados obtenidos de las flores aplicando la fórmula:

$$Rf = \frac{Distancia\ recorrida\ por\ el\ compuesto}{Distancia\ recorrida\ \ por\ el\ disolvente}$$

Estándar:	QUERCETINA:	5.06/5.50 = 0.92
Muestra:	FLORES:	5.06/5.50 = 0.92

4.1.3. Resultados de índices de irritación

Tabla 5. Resultados de los índices de irritación ocular según grupos distribuidos

Grupo	N° de ensayos HET-CAM	Sustancia	Concentración	índices de irritación ocular
Grupo I	03	Colirio de Ciprofloxacino	1 mg/mL (Estándar)	0 a 0.9 No irritante
Grupo II	03	Colirio de Ciprofloxacino	2 mg/mL (Estándar)	1 a 4.9 Ligeramente irritante
Grupo III	03	Colirio de Ciprofloxacino	3 mg/mL (Estándar)	1 a 4.9 Ligeramente irritante
Grupo IV	03	Colirio de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam	1 mg/mL (Muestra a estudiar)	0 a 0.9 No irritante
Grupo V	03	Colirio de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam	2 mg/mL (Muestra a estudiar)	0 a 0.9 No irritante
Grupo VI	03	Colirio de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam	3 mg/mL (Muestra a estudiar)	0 a 0.9 No irritante

Grupo VII	03 Control Negativo	Suero fisiológico NaCl 0,9%.	-	Control Negativo No irritante
Grupo VIII	03 Control Positivo	Lauril Sulfato de Sodio - SLS 1%.	-	Control Positivo Irritante
Grupo IX	03	Colirios de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam	4 mg/mL (Muestra a estudiar)	0 a 0.9 No irritante

4.1.4. prueba hipotética:

Formulación de supuestos generales.

Ha: El colirio elaborado a partir de las flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, es una solución adecuada ya que no provoca irritación ocular aguda analizada por el método HET-CAM.

Ho: El colirio elaborado a partir de las flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, analizado por el método HET-CAM resultó una solución inadecuada porque provocó irritación ocular aguda.

Prueba Estadística.

Prueba t de Student para dos muestras relacionadas - Prueba paramétrica.

Elección del nivel de significación.

$\alpha = 0,05$

Regla de decisión

Rechazar la hipótesis nula si $\rho < \alpha$.

Cálculos estadísticos

Si $\rho < \alpha$, rechazar la hipótesis nula.

Tabla 6. Análisis de la irritación ocular aguda del colirio elaborado de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, analizado por el método HET-CAM

	P
Irritación ocular aguda previa al análisis	0.000*
Después del análisis de irritación ocular aguda	

*Prueba t de Student para dos muestras relacionadas.

Cuando se encontró que p era inferior a 0,05 (p=0,000), se rechazó la hipótesis nula y el colirio elaborado a partir de las flores de *Cantua buxifolia* Juss analizadas por el método HET-CAM resultó una solución adecuada ya que no provocó efectos agudos en los ojos.

Formulación de la Hipótesis específica I

Ha: El colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, elaborado a partir de las flores a diferentes concentraciones y analizado por el método HET-CAM es una solución adecuada ya que no provoca irritación ocular aguda.

Ho: El colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, elaborado a partir de las flores a diferentes concentraciones analizada por el método HET-CAM, es una solución no apta ya que genera Irritación ocular aguda.

Prueba Estadística.

Prueba de chi-cuadrado paramétrica de dos muestras relacionada.

Elección del nivel de significación.
$\alpha = 0,05$

Regla de decisión

Si $\rho < \alpha$, rechazar la hipótesis nula.

Cálculos estadísticos
Si $\rho < \alpha$, rechazar la hipótesis nula.

Tabla 7. Colirio de *Cantua buxifolia* Juss Irritación ocular aguda en concentraciones de 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL y 4 mg/mL preparado por el método HET-CAM

	P
Irritación ocular aguda previa al análisis	0.000*
Después del análisis de irritación ocular aguda	

*Chi-cuadrado de dos muestras relacionadas.

Se rechazó la hipótesis nula cuando se encontró que p era menor a 0.05 (p=0.000), es decir, el análisis de diferentes concentraciones de *Cantua buxifolia* Juss colirio ex Lam por el método HET-CAM fue una solución adecuada ya que no provoca irritación ocular aguda.

Formulación de la Hipótesis específica II

Ha: Las concentraciones del colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam**,** en comparación con el colirio de Ciprofloxacino son aptas porque no son irritantes.

Ho: Las concentraciones del colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam**,** en comparación con el colirio de Ciprofloxacino no son aptas porque son irritantes.

Prueba Estadística.

No se requiere análisis estadístico.

Por lo tanto, rechazamos la hipótesis nula de que el colirio de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, tiene una concentración adecuada en comparación con el colirio de ciprofloxacino debido a sus propiedades no irritantes.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Los valores de los parámetros de prueba como temperatura, humedad relativa, días de incubación, peso, tamaño y densidad de los huevos fertilizados corresponden a los parámetros establecidos en la técnica HET-CAM INVITTOX (protocolo 108) sugerida por Luepke (34). Los cuales fueron empleados en la presente investigación, Este trámite fue realizado por Fernández A. que, en el año 2014, analizaron la toxicidad ocular de la solución oftálmica de voriconazol y fluconazol utilizando el método HET-CAM. (16), método utilizado en el presente trabajo de investigación.

Por su parte, Quintana C, Hornes J. realizo un trabajo de investigación en que el objetivo fue medir los efectos antiinflamatorios de extractos hidroalcohólicos de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, sobre edema plantar en ratas albinas, identificar metabolitos secundarios, concentraciones óptimas y comparar sus efectos con ibuprofeno. En sus resultados obtuvieron que el extracto, presenta metabolitos secundarios (Flavonoides) con una concentración óptima para la acción antiinflamatoria (8).

Asimismo, Rivero M, et al. Dentro de los hallazgos señalan que, todos aquellos productos evaluados con protocolos HET-CAM que resultaron no irritantes, también resultaron no irritantes en el estudio clínico de uso del producto; lo mismo señalan para los productos cosméticos irritantes en cuanto a protocolos HET-CAM y estudios clínicos oftalmológicos (15). En este sentido, De Araujo L, et al., hace hincapié que se puede utilizar el protocolo francés o alemán del HET-CAM porque ambos identifican en forma precisa los grados de irritación (14) y finalmente, tenemos a Taype E., que avala los métodos alternativos como HET – CAM, para predecir el potencial de sensibilización, así como para detectar el potencial de irritación ocular de los químicos utilizados en cosméticos (10).

Para las flores, se realizó la cromatografía en capa fina del extracto etanólico de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, para lo cual la muestra y el estándar se sembraron capilarmente 20 veces en placas de cromatografía, usando como Fase estacionaria la gel de sílice G y como fase móvil: Cloroformo:Metanol (3:1) revelándose la cromatoplaca en

la lámpara de luz UV a 254 nm y 365 nm. Siendo el resultado: Presencia de Flavonoides en Flores.

Respecto a los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de los extractos de flores de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, se demostró la presencia de metabolitos como alcaloides, compuestos fenólicos, taninos y flavonoides, siendo este último en mayor abundancia.

Cabe mencionar que en el tamizaje fitoquímico realizado en hojas como en flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, se encontró también fenoles que poseen actividad bacteriostática o bactericida, fungicida y viricida. Son más efectivos sobre las bacterias grampositivas que sobre las gramnegativas, lo cual además de poseer un efecto antiinflamatorio también puede tener actividad bacteriostática o bactericida, similar a la muestra utilizada como estándar: Ciprofloxacino (Químicamente Puro), el cual se elaboró según los parámetros de la USP 43.

Los resultados en relación a los índices de irritación ocular según grupos distribuidos, para los grupos I, IV, V, VI y IX, los índices fueron No irritantes y los grupos II y III son ligeramente irritante. Siendo el grupo VII del Control Negativo y el grupo VIII del Control Positivo.

En la presente investigación se observó, que las concentraciones del colirio elaborado de las flores de la *Cantua buifolia* Juss, ex lam, pueden ser utilizadas como materia prima en la obtención de extractos químicos naturales de naturaleza antiinflamatoria, y que pueden ser utilizados por la industria farmacéutica, para la substitución de los Colirios sintéticos, quedando abierta los estudios posteriores para comprobar su actividad bacteriostática o bactericida.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. Se analizó que las concentraciones de colirio de *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, a 1 mg/mL, 2 mg/mL y 3 mg/mL, el índice de irritación eran No irritante y la concentración de 4 mg/mL. también, evaluada por el método HET-CAM.

2. Se evaluó que las concentraciones del colirio de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam de 1 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml en comparación con el colirio de ciprofloxacina en la misma concentración dio los siguientes resultados: No irritante, mientras que la Ciprofloxacina dio como resultado: No irritante y ligeramente irritante. Estos resultados se correlacionaron con la abundancia de flavonoides encontrados durante la evaluación fitoquímica de sus flores.

3. Se identificó a través de un estudio fitoquímico la presencia de Flavonoides en el extracto etanólico de las flores de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, que genere efecto antiinflamatorio.

4. Se demostró mediante un análisis de Cromatografía de Capa Fina, sobre el extracto etanólico de la *Cantua buxifolia* Juss, ex Lam, la presencia de Flavonoides en sus Flores más que en sus hojas.

5. En conclusión, se detectaron metabolitos secundarios, más en los extractos de las flores que en las hojas, siendo en mayor abundancia los flavonoides, lo cual se demostró al aplicar los Colirios elaborados, a diferentes concentraciones, la no irritación a través del método de membrana corioalantoidea de embrión de pollo (hen's egg test on chorioallantoic membrane (HET-CAM, siglas en inglés)).

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Samimi MS, Mahboobian MM, Mohammadi M. Ocular toxicity assessment of nanoemulsion in-situ gel formulation of fluconazole. Hum Exp Toxicol. [Internet]. 2021; 40(12):2039-2047. Disponible en: https://doi:10.1177/09603271211017314
2. GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet Glob Health. 2021 Feb;9(2):e144-e160. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7.
3. Cáceres Catalina Mayra "Caracterización de la Morbilidad visual y ocular de la Población atendida en los Departamentos de Antioquia, Caldas, Risaralda, Quindío, según los reportes de los RIPS de los años 2009- 2010". Bogotá, "Universidad de la Salle" Facultad de Ciencias de la Salud.2013.
4. Santiváñez Acosta R, Cabrera Meléndez J. Catálogo florístico de plantas medicinales peruanas [Internet]. Lima - Perú: MINSA - Instituto Nacional de Salud; 2013 [consultado 6 agosto 2021]. 55p. Disponible en: https://bvs.ins.gob.pe/insprint/CENSI/catalogo_floristico_plantas_medicinales.pdf
5. 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. [tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2018.
6. Pipa M, Eulogio J, Moy B, Ramírez G. Evaluación in vitro de la irritabilidad ocular en mucílagos de cinco especies vegetales de interés, mediante el método HET-CAM. Lima Perú 2015. [tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2015.
7. Eulogio J, López Z, Quijandría J, Ramírez G. 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" [tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2015.
8. Quintana C, Hornes J. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las flores de la *Cantua buxifolia* j."flor sagrada de los incas" en

edema subplantar inducido en ratas albinas. [tesis]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018.

9. Sánchez M. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las flores de *Cantua buxifolia* "Cantuta" EN *Rattus rattus* var. Albinus. [tesis]. Lima: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2019.
10. Taype Espinoza E. Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética. [tesis]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2015.
11. Kuch G, Carpio A. Evaluación del potencial irritante del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* ducke" palo de rosa" en *Oryctolagus cuniculus* cepa New Zealand-Iquitos, 2014. [tesis]. Lima: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.
12. Soto Vásquez M, Soto Vásquez K, Serrano Bringas A. Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. ex Lam. (Polemoniaceae) "Flor Sagrada de los Incas". [Internet]. 2014 [consultado 8 agosto 2021]. Arnaldoa, 21(1): 81-90. Disponible en:https://biblat.unam.mx/es/revista/arnaldoa/articulo/metabolitos-secundarios-y-efecto-antibacteriano-in-vitro-del-extracto-hidroetanolico-de-las-flores-de-cantua-buxifolia-juss-ex-lam-polemoniaceae-flor-sagrada-de-los-incas
13. Sánchez M, Vega E. Estudio fitoquímico preliminar de las flores de *Cantua buxifolia* juss. ex lam. "flor sagrada de los incas". [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2012.
14. De Araujo Lowndes Viera L, Silva R, da Silva C, Presgrave O, Boas M. Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. Toxicol In Vitro. [Internet]. 2022; 78:105255. Disponible en: https://doi: 10.1016/j.tiv.2021.105255.
15. Rivero M, Lenze M, Izaguirre M, et al. Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. Food Chem Toxicol. [Internet].2021; 153:112229. Disponible en: https://doi: 10.1016/j.fct.2021.112229
16. Fernández-Ferreiro A, González Barcia M, Gil Martínez M, Blanco Méndez J, Lamas Díaz M, Otero Espinar F. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM. Farm Hosp. [Internet]. 2014 [consultado

8 agosto 2021]; 38(4): 300-304. Disponible en: https://dx.doi.org/10.7399/FH.2014.38.4.7343

17. Ministerio del Ambiente. ¿Sabes cuál es la flor nacional del Perú? [Internet]. Lima – Perú: MINAM; 2021 [consultado 6 agosto 2021]. Disponible en: https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/42010-disminuye-en-45-casos-de-conjuntivitis-en-el-ino-se-recomienda-lavado-de-manos-y-evitar-automedicacion
18. Bussmann Rainer W, Douglas S. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía-La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. [Internet]. Perú: Centro William L. Brown; 2015 [consultado 8 agosto 2021]. 293 p. Disponible en: https://doi: 10.13140/RG.2.1.3485.0962
19. Dourojeanni M. Animales y plantas como símbolos patrios. [Internet]. Perú: Servindi - Servicios de Comunicación Intercultural; 2018 [consultado 8 agosto 2021]. Disponible en: https://www.servindi.org/actualidad-noticias/18/02/2018/animales-y-plantas-como-simbolos-patrios
20. Diario oficial El Peruano. Cantuta: la flor nacional del Perú que identifica nuestra historia e identidad cultural. [Internet]. Perú: El Peruano; 2021: [consultado 25 agosto 2021]. Disponible en: https://www.elperuano.pe/noticia/130624-cantuta-la-flor-nacional-del-peru-que-identifica-nuestra-historia-e-identidad-cultural.
21. Carhuapoma Yance M. Plantas aromáticas nativas del Perú Biocomercio de fragancias, sabores y fitocosméticos. Perú: CONCYTEC, 2011.
22. Ministerio de Salud. Guía de Práctica Clínica para diagnóstico y tratamiento de la conjuntivitis. MINSA [Internet]. MINSA; 2016 [consultado 20 agosto 2021]. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1903140/R.D.%20N%C2%BA%20101-2021-DG-HNAL.pdf.pdf
23. Paladines F, Sánchez J, Herrera J. Epidemiologia y tratamiento de la conjuntivitis. RECIAMUC [Internet]. 2021[consultado 24 agosto 2021]; 5(1):170-179.
24. Ministerio de Salud. Guía de Práctica Clínica para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades externas del párpado y conjuntiva en el primer nivel de atención. [Internet]. MINSA; 2016 [consultado 9 agosto 2021]. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3687.pdf
25. Fernández Ferreyro Anxo. Formulación magistral oftálmica antiinfecciosa. España: SEFH. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; 2019.

26. Bilbao Laiseca A. Colirios. Panorama actual del medicamento. 2018; 42(414):602-608.
27. Comisión Permanente de la Farmacopea. Farmacopea. USP 43 – NF38. 43th. ed. Rockville MD: The United States Pharmacopeial Convention Inc; 2020.
28. Martínez M. Alternativas a la experimentación en animales en toxicología: Situación actual. Rev. Española Acta Bioética. [Internet] 2007 [consultado 13 setiembre 2021]. 13 (1):41-52. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100005
29. Spielmann H, Gerner L, Kalweit S, Moog R, et al; interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. Rev. Toxicología in vitro [Internet] 1991 [consultado 15 setiembre 2021]; 5(5):539-542. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0887- 2333(91)90089-V
30. Kishore A, Surekha P, Sekhar P, Srinivas A, Murthy P. Hen egg chorioallantoic membrane bio-assay: an in vitro alternative to draize eye irritation test for pesticide screening. Int J Toxicol. [Internet] 2008 [consultado 15 setiembre 2021]; 27: 449–453. Disponible en: https://doi.org/10.1080/10915810802656996
31. Lokman N, Elder A, Ricciardelli C, Oehler M. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. Int J Mol Sci. [Internet] 2012 [consultado 15 setiembre 2021]; 13(8): 9959– 9970. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ijms13089959
32. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance [Internet]. Francia: OECD; 2011; [consultado 15 setiembre 2021]. Disponible en:https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/overview-of-good-laboratory-practice.htm
33. Draize J, Woodard G, Calvery H. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther [Internet]. 1944; [consultado 12 setiembre 2021]; 82(3): 377-390. Disponible en: https://jpet.aspetjournals.org/content/82/3/377
34. Luepke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. Food Chem Tox [Internet]. 1985; [consultado 16 setiembre 2021]; 23(2):287-91. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4

35. Ying Y, Xinfeng Y, Wengai Z, Jinheng C, Jinyu X, Guangyu Y, et al. Combinated in vitro test as an alternative to in vivo eye irritation tests. Altern Lab Anim. [Internet]. 2010; [consultado 19 setiembre 2021]; 38(4):303-14. Disponible en: https://doi.org/10.1177/026119291003800413
36. Balls M, Botham P, Bruner L, Spielman H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicol in Vitro [Internet]. 1995; consultado 22 setiembre 2021]; 9(6):871-929. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0887-2333(95)00092-5
37. Bolufe Rohler A. Tesis de Doctorado en Ciencias Matemáticas "Búsqueda de Población Mínima – Un algoritmo de optimización escalable para Problemas Multi-modales". Universidad de la Habana de la Facultad de Matemáticas y Ciencia de la Computación. 2015
38. Lock Sing de Ugaz, Olga "Investigación fitoquímica", métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Departamento de Ciencias. 1994. Disponible en: https://doi.org/10.18800/9788483909522
39. Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, (cols) (2001) Refining procedures for the administration of substances. Laboratory Animals 35, 1-41.
40. Russell WMS y Burch RL(1959) The principles of Human Experimental Technique, London, UK: Methuen. 238 pp.

CAPÍTULO VIII. ANEXO 1: FICHA DE OBSERVACIÓN Y OBTENCIÓN DE DATOS (MÉTODO HET CAM)

CONTROL	TIPO DE CONTROL	TIEMPO DE REACCIÓN EN SEGUNDOS			INDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACIÓN		
CIRPOFLOXACINO 1mg/mL HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	CONTROL DE COMPARACIÓN					NO IRRITANTE
CIRPOFLOXACINO 2mg/mL HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	CONTROL DE COMPARACIÓN					LIGERAMENTE IRRITANTE
CIRPOFLOXACINO 3mg/mL HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	CONTROL DE COMPARACIÓN					LIGERAMENTE IRRITANTE
Colirio *Cantua Buxifolia* Juss, ex Lam 1mg/mL (Colirio Preparado) HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	CONTROL DE ESTUDIO					NO IRRITANTE

Colirio *Cantua Buxifolia* Juss, ex Lam 2mg/mL (Colirio Preparado) HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	CONTROL DE ESTUDIO					NO IRRITANTE
Colirio *Cantua Buxifolia* Juss, ex Lam 3mg/mL (Colirio Preparado) HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	CONTROL DE ESTUDIO					NO IRRITANTE
SUERO FISIOLÓGICO **CLORURO DE SODIO 0.9%** HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	NEGATIVO					NO IRRITANTE
LAURIL SULFATO DE SODIO HUEVO 1 HUEVO 2 HUEVO 3	POSITIVO					MUY IRRITANTE
Colirio *Cantua Buxifolia* Juss, ex Lam 4mg/mL (Colirio Preparado) HUEVO 1 HUEVO 2	CONTROL DE ESTUDIO					NO IRRITANTE

HUEVO 3						

I.I = (301-seg H / 300) 5 + (301-seg L / 300) 7 + (301-seg C / 300) 9

I.I. = INDICE 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	LIGERAMENTE IRRITANTE
5,0 – 8,9	IRRITANTE
9,0 – 21,0	MUY IRRITANTE

ANEXO 2: CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. Nº 3796
Tel: 017512863 RPM 963689079
Email: jocamde@gmail.com

CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, **ENRIQUE CHRISTIAN MONTÁNCHEZ MERCADO**, estudiante en la Unidad de Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación científica, ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta silvestre conocida con el nombre vulgar de **"cantuta"**, la muestra ha sido estudiada e identificada como ***Cantua buxifolia* Juss. ex Lam.** Según la base de Tropicos que sigue la clasificación de los grupos de filogenia de las angiospermas (APG), sistema moderno de clasificación de las angiospermas publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), comparado con el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. et. al (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

Categorías	Sistema APG-2016	Sistema de Cronquist 1981
Reino	Plantae	Plantae
División	Angiospermae	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae	Asteridae
Orden	Ericaceae	Solanales
Familia	Polemoniaceae	Polemoniaceae
Género	*Cantua*	*Cantua*
Especie	*Cantua buxifolia* Juss. ex Lam.	*Cantua buxifolia* Juss. ex Lam.

Nombres vulgares: "cantuta", "Flor sagrada de los incas"

Se expide la presente certificación para los fines de investigación científica.

Lima, 23 de abril del 2021

José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

JR. SANCHEZ SILVA N° 156- piso 3. Urb. Santa Luzmila. Lima 07
Email. joricampos@yahoo.es; jocamde@gmail.com

"Año del Fortalecimiento da la Soberanía Nacional"

C O N S T A N C I A N 041 -2022-USM-MHN

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

La muestra vegetal (ramas floríferas) recibida de Enrique Christian MONTANCHEZ MERCADO estudiante del Doctorado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como*: Cantua buxifolia* Juss. ex Lam. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

Orden: Ericales

Familia:

Polemoniaceae

Género: *Cantua*

Especie: *Cantua buxifolia* Juss. ex Lam.

Nombre común: "cantuta"

Determinado por Ng. Hamilton Beltrán Santiago

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

Lima, 08 de junio de 2022

MUSEO DE HISTORIA NATURAL — JEFE — Herbario San Marcos - USM

Dra. Joaquina A. Albán Castillo

Jefa del Herbario SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb