

Efecto irritante *in vitro* del gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) “pitahaya” por el método HET-CAM

Irritant effect in vitro of the gel made with aqueous extract of the mesocarp of *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) “pitahaya” by the HET-CAM method

Neuman Pineda P., Luis Cervantes G., Héctor Vilchez C., Laura Villanueva B. & Victor Pulido C.

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima, PERÚ; Instituto de Investigación, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima, PERÚ



Resumen

En el presente estudio, se evaluó *in vitro* el efecto irritante del gel elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya", empleando el método de HET-CAM para demostrar seguridad y eficacia de la formulación. La "pitahaya" fue recolectada en la provincia de Huaral, departamento de Lima, en el sector denominado Virgen de la Esperanza, a una altitud de 190 m s.n.m. El gel fue preparado a base de carbopol, trietanolamina y agua desionizada; su preparación tuvo lugar en el Laboratorio de Industria Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Para la elaboración del extracto acuoso, se utilizaron 300 g de mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* "pitahaya" por litro de agua, concentrándose el solvente con ayuda del rotavapor. Las concentraciones de gel preparado con el extracto acuoso fueron del 0.5 % y 1 % y se emplearon NaOH 0.1N y LSS como control positivo. El estudio fitoquímico determinó la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, quinonas, glucósidos, terpenoides y fenoles. Las formulaciones farmacéuticas elaboradas con el gel mantuvieron intacta la membrana corioalantoidea sin provocar efecto irritante; el control a base de hidróxido de sodio y lauril sulfato de sodio (LSS) resultó ser irritante moderado y severo. Según el método de HET-CAM, el índice de irritación obtenido para todas las formulaciones de extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* "pitahaya" permitieron clasificar al producto como no irritante. Se espera utilizar la formulación en ensayos de fase I.

Palabras clave: efecto irritante, extracto de "pitahaya", gel, mesocarpio, membrana corioalantoidea

Abstract

In this study, we evaluated *in vitro* the irritant effect of the gel made with aqueous extract of mesocarp of *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" using the HET-CAM method to demonstrate the safety and efficacy of the formulation. The pitahaya fruits were collected in the province of Huaral, department of Lima, in the area called Virgen de la Esperanza, at an altitude of 190 meters above sea level. The gel was prepared based on carbopol, triethanolamine and deionized water; its preparation took place in the Pharmaceutical Industry Laboratory of the Faculty of Pharmaceutical Sciences and Biochemistry of the Inca Garcilaso de la Vega University. For the elaboration of the aqueous extract, we used 300 g of mesocarp of *Hylocereus megalanthus* "pitahaya" per liter of water, concentrating the solvent with the help of a rotavap. The gel concentrations prepared with the aqueous extract were 0.5 % and 1 %, and NaOH 0.1N and SLS were used as a positive control. The phytochemical study determined the presence of alkaloids, saponins, flavonoids, quinones, glycosides, terpenoids and phenols. The pharmaceutical formulations made with the gel kept the chorioallantoic membrane intact without causing an irritant effect; the control based on sodium hydroxide and sodium lauryl sulfate (SLS) turned out to be moderate and severe irritant. According to the HET-CAM method, the irritation index obtained for all aqueous extract formulations of the mesocarp of *Hylocereus megalanthus* "pitahaya" allowed classifying the product as nonirritating. The formulation is expected to be used in phase I tests.

Keywords: irritating effect, pitahaya extract, gel, mesocarp, chorioallantoic membrane.

Citación: Pineda, N.; E. Vilchez; L. Villanueva & V. Pulido. 2019. Efecto irritante *in vitro* del gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" por el método HET-CAM. *Arnaldoa* 26 (1): 369 - 380. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26118>

Introducción

El Perú tiene una vasta historia de medicina natural y alternativa en la cual el empleo de productos naturales

domesticados forma parte de la primera elección para el tratamiento de muchas enfermedades (Córdova, 2009). El mercado mundial de medicinas herbales (extractos y

fitoterapéuticos) es aproximadamente de 14 billones de dólares anuales, es importante resaltar que si bien se estima que 10,000 plantas son utilizadas medicinalmente, solo un pequeño número llega a convertirse en medicamento (Rugeles, 2012). Cada día la industria farmacéutica está a la búsqueda de productos naturales con potenciales terapéuticos a esto se suma la industria cosmética, que busca novedosas alternativas para la elaboración de sus productos. El desarrollo de drogas innovadoras permite la obtención de nuevos medicamentos para así prevenir y tratar mejor las enfermedades, ello mejora la calidad de vida y la hace más productiva; por tanto, la misión de la investigación farmacéutica es desarrollar drogas seguras y eficaces (Bayona & Fajardo, 2012). Así como, está a la búsqueda de nuevos componentes bioactivos, también la industria farmacéutica y cosmética, está a la búsqueda de alternativa novedosas que puedan reemplazar a las ya existentes y que propongan una mejora en las técnicas y costos analíticos. Los laboratorios evalúan la irritabilidad ocular *in vivo* según el método de Draize y esta requiere de la aplicación de las sustancias bioactivas de ensayo en la conjuntiva del animal de experimentación (“conejos”), sometiéndolo en muchos casos al dolor, ulceración y hasta necrosis de las estructuras oculares (González *et al.*, 2006). Hoy la búsqueda de métodos alternativos *in vitro* para evitar el daño y exposición a animales es una gran urgencia por la comunidad científica y con el fin de calmar los reclamos de un sector de la población es que pruebas como HET-CAM debe ser más empleada ya que además cumplen con la implementación de las tres “erres” (RRR) de Rusell y Burch: reducción, refinamiento y reemplazo (Bruner & Shadduck, 1991).

La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega es una institución dedicada a la innovación científica y tecnológica, donde se aplican métodos alternativos como el HET-CAM o ensayo de membrana corioalantoidea del huevo de “gallina” (hen’s egg test chorioallantoic membrane) en los bioensayos de actividad irritante, u otros métodos alternativos (Wilson & Steck, 2000).os investigadores (Wilson & Steck, 2000).

Material y métodos

Hylocereus megalanthus (Cactaceae) “pitahaya” fue recolectada en la provincia Huaral, departamento Lima, en el sector denominado Virgen de la Esperanza, a una altitud de 190 msnm. Para la recolección de los frutos se consideró su aspecto externo. Los frutos fueron acondicionados en cajas de tecnopor con compresas de gel frío marca Thera Med y transportados a Lima donde en el laboratorio SL08LA05 de FCsFB se procedió al lavado con agua destilada y al secado. Para separar el mesocarpio se utilizó un cuchillo fino. El rendimiento obtenido fue 0,987 g mesocarpio por 5 kilos de fruto. Luego se pesó 300 g de mesocarpio y se agregó en 1000 ml de agua desionizada, se dejó hervir por 10 minutos y se procedió a enfriar para luego ser tamizado en un cernidor fino (ESSALUD 2017). Se utilizó el rotavapor para concentrar el filtrado, se programó el equipo a 60°C y a 50 rpm obteniéndose finalmente un aproximado de 50 ml. El producto obtenido se congeló en un frasco ambar hasta su posterior uso (Labotec. Scientz-50N). El gel se elaboró con la formulación magistral a base de Carbopol® 940 Polymer de alta viscosidad, trietanolamina agente gelificante, ácido ascórbico como conservador y agua desionizada (Fernández, 2018).

Screening fitoquímico

La clasificación taxonómica del fruto de la “pitahaya” fue efectuada en base al sistema de clasificación de Cronquist (1981). Se realizó en la Universidad San Martín de Porres por la bióloga Bertha Loja. El análisis fitoquímico de caracterización se realizó en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega de acuerdo al método descrito por Lock y Domínguez (Lock, 2016; Domínguez, 1973). Se realizaron las pruebas de Molish, Fehling, Shinoda, cloruro de hierro 1%, Liebermann-Burchard, Mayer, Antrona, Draguendorff, Wagner, Borntrager.

Modelo experimental

Se utilizaron huevos fértiles de *Gallus gallus domesticus*, especie resistente a enfermedades, suministrada por la criadera Oshin Osorio en el distrito de Chosica, departamento de Lima. El peso de los huevos fue de 50 y 60 g. Los huevos fueron lavados, secados e incubados en el laboratorio de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega utilizando una estufa modificada a una temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y, a una humedad del $65 \pm 2\%$. Los huevos fueron incubados por 10 días (Laignier *et al.*, 2009). El desarrollo de la viabilidad de la membrana corioalantoidea fue seguido empleando un ovoscopio (Steiling, 1994).

Los huevos seleccionados fueron marcados, señalando la cámara de aire con un bolígrafo, luego se expuso la membrana corioalantoidea cortando el huevo en forma circular y retirando la membrana blanquecina que cubre la cáscara. Una vez retirada esta primera membrana quedó expuesta la membrana corioalantoidea que es transparente y con una abundante irrigación sanguínea.

Grupos experimentales

Para determinar el índice de irritabilidad se formaron grupos aleatorios de 4 huevos cada grupo. Los grupos fueron: grupo I normal (+) 0,2 ml de suero fisiológico, grupo II control (+) 0,2 ml de NaOH 0,1N 0,2 ml, grupo III control (+) lauril sulfato de sodio (LSS) 1% 0,2 ml, grupo IV gel de *Hylocereus megalanthus* “pitahaya” 0,5% 0,2 ml, grupo V gel de *Hylocereus megalanthus* “pitahaya” 1% 0,2 ml.

Medición del índice de irritabilidad

Se administró 0,2 ml del gel elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* “pitahaya” a la membrana corioalantoidea durante un periodo de 20 segundos. Se realizó la observación de la membrana valorando la posible aparición hemorragia, lisis y coagulación. Se anotó el tiempo de aparición en segundos durante un tiempo máximo de observación de 5 min. Se administraron los controles para referenciar el resultado obtenido NaOH a 0,1 N y LSS al 1%. El índice de irritación ocular se calculó a partir de la siguiente expresión (Rivera, 2017).

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

Donde:

I.I = Índice de irritación

H = Hemorragia

L = Lisis de los vasos

C = Coagulación

Seg = El tiempo en segundos en que aparece cada reacción.

Tabla 1. Clasificación de irritabilidad para el método de HET-CAM.

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

Resultados

En el estudio fitoquímico preliminar se determinó los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus*

(Cactaceae) “pitahaya” donde se puede apreciar compuestos como alcaloides, saponinas, flavonoides, quinonas, glucósidos, terpenoides y fenoles.

Tabla 2. Screening fitoquímico preliminar extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* “pitahaya”.

Metabolito secundario	Reactivo usado	Extracto acuoso del mesocarpio de (<i>Hylocereus megalanthus</i>) “pitahaya”
	Dragendorff	
Alcaloides	Mayer	+++
	Wagner	
Saponinas	Agua destilada	++
Flavonoides	Shinoda	+++
Quinonas	Borntrager	+
Terpenos	Lieberman	++
Fenoles	FeCl ₃	++
Glucósidos	Antrona	+

Tabla 3. Resultado de la prueba HET-CAM. Método observacional: Control.

Control	Tiempo de reacción en segundos			Clasificación
	Hemorragia	Lisis	Coagulación	
NaOH	170	110	150	Irritante severo
LSS	301	120	250	Irritante moderado

Evaluación del efecto del NaOH y el LSS sobre la membrana corioalantoidea.

Tabla 4. Resultado de la prueba HET-CAM. Método observacional. Extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya".

Muestra	Tiempo de reacción en segundos			Clasificación
	Hemorragia	Lisis	Coagulación	
1%	299	300	300	No irritante
0.5%	300	300	300	No irritante

Evaluación del extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* "pitahaya" sobre la membrana corioalantoidea.

Tabla 5. Resultado de la prueba HET-CAM Método observacional. Gel elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya".

Muestra	Tiempo de reacción en segundos			Clasificación
	Hemorragia	Lisis	Coagulación	
1%	300	300	300	No irritante
0.5%	300	300	300	No irritante

El índice de irritabilidad obtenido para el gel elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* "pitahaya" en ambas concentraciones, clasifica como no irritante, el control a base de hidróxido de sodio y lauril sulfato de sodio, resultó ser irritante moderado y severo.

Discusión

Muchos pueblos del interior del Perú utilizan en la medicina tradicional las hojas, frutos y raíces para el tratamiento de sus enfermedades, pero muchas veces no consideran las reacciones adversas como el potencial irritante de estos productos.

Los laboratorios de avanzada se encuentran a la búsqueda de nuevos modelos de carácter experimental para demostrar seguridad, eficacia y eficiencia de los bioextractos obtenidos que posteriormente serán utilizados en seres humanos, para lo cual se requiere un número significativo de animales de experimentación. (Vaquero & González, 1990).

Una de las ormas para disminuir el uso de animales de experimentación es el método de HET-CAM (Bruner & Shadduck, 1991). Este procedimiento de la membrana corioalantoidea del huevo de "gallina" (hen's egg test chorioallantoic membrane, Het-Cam) para determinar la irritación ocular es sencillo, sensible, de fácil elaboración y bajo costo (Russell & Burch, 1959).

Los resultados obtenidos en el screening fitoquímico son similares a los hallados por Flores & García (2016) al realizar el perfil fitoquímico y determinar la actividad antioxidante de extractos de *Hylocereus megalanthus* "pitahaya".

Los resultados del índice de irritabilidad son similares a los estudios realizados por Camones (2013), quien evaluó el efecto irritante de formulaciones cosméticas a base de "camu camu" y de Rivera (2017), quien también evaluó la actividad irritante de la raíz, tallo y hojas de "cuturumasa" encontrando que sus concentraciones no son irritantes.

Estos resultados son importantes para la industria farmacéutica y la industria cosmética porque que pueden obtener resultados en menor tiempo con la misma seguridad, eficiencia y eficacia que la prueba Draize.

Conclusiones

Se detectaron por el screening fitoquímico la presencia de compuestos como alcaloides, saponinas, flavonoides, quinonas, terpenos, fenoles, glucósidos en el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya".

El índice de irritabilidad para el gel elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" a la concentración de 1% fue I.I=0,0866, no irritante y el gel elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* "pitahaya" a la concentración de 0,5% fue I.I= 0,0699, no irritante.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Cervantes Liñán, Rector de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega por permitirnos el acceso y uso del equipamiento de los Laboratorios de Especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la UIGV. A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Lima, Perú, por el financiamiento.

Contribución de los autores

N. P. P.: participó en la concepción y diseño del estudio, en el análisis e interpretación de datos, redacción del manuscrito, revisión crítica del artículo y la aprobación de la versión final a publicar. L.C.G. participó en el diseño del estudio, en el análisis de datos y en la redacción crítica del manuscrito. L. V. B.: contribuyó con la información botánica y recolección de las especies vegetales, los huevos de gallina fértiles y apoyo logístico. H. V. C.: contribuyó con el estudio fitoquímico de las especies vegetales, los análisis de HET-CAM y con la recolección de resultados.

V. P. C.: contribuyó en la redacción del manuscrito, revisión crítica del artículo y la aprobación de la versión final a publicar.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Literatura citada

- Bayona, A. & N. Fajardo.** 2012. Desarrollo de nuevos medicamentos: oportunidades y beneficios para el Perú. *Rev. Perú Med. Exp Salud Pública.* 2012; 29(4):521-8.
- Bruner, L. H. & J. A. Shaddock.** 1991. *Esex-Sorlie D.* Alternative methods for assessing the effects of chemical on the eye. *Dermal and Ocular Toxicology. Fundamental and Methods*, New York: CRC Press; 1991: 585-608.
- Camones, I.** 2013. Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método het cam. *Revista Horizonte Médico. USMP.* 12 (2): 12-18
- Córdova, J.** 2009. Uso y utilización de plantas medicinales en universidades de Lima [Tesis para optar el Título de Licenciado en Antropología] Facultad de Ciencias Sociales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 183 pp.
- Cronquist, A.** 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants.* Copyright © 1981 Columbia University.
- Domínguez, A.** 1973. *Métodos de Investigación. Fitoquímica.* México: Editorial Limusa.
- Fernandez, E.** 2018. Cuestionario de formulación magistral en dermatología y dermocosmética Hidrogeles. pág. 98-101. <http://www.elsevier.es>.
- Flores J, García M.** 2016. Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de extractos de pitahaya *Hylocereus undatus*, *Revista de divulgación científica jóvenes en la ciencia* [Revista online]. 2016 [citado 04 de agosto del 2018]: 2 (1): 29-33.
- González, Y.; A. Orestes; A. Castillo; C. Sánchez; J. Molina; A. Pizarro & E. Silveira.** 2006. Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método *in vitro* en sustitución de la prueba en conejos. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET.* 7 (3): 1-2.
- Laignier, E.; F. Chiva; F. Masquio; M. Daflon & H. Corroxitex.** 2009. BCOP and HET CAM as alternative methods to animal experimentation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; (45): 759-766.
- Lock, O.** 2016. *Investigación Fitoquímica. Metodos en el Estudio de Productos Naturales.* 3ra ed. Departamento de Ciencias Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima-Perú. 288 pp.
- Mercedes, M.** 2017. HET – CAM del extracto etanolico de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. "CUTURRUMASA" [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico] Facultad de Ciencias Farmacéuticos y Bioquímica. UIGV.
- Rivera, M.** 2017. Actividad irritante ocular *in vitro* por el metodo del het – cam del extracto etanolico de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. "cuturrumasa". Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico y Bioquímico, UIGV, Lima. 80 pp
- Rugeles, L.** 2012. La cadena de valor de los ingredientes naturales del Biocomercio para las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética – FAC. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Fondo Biocomercio. Primera Ed. 222 pp.
- Rusell, W. & R. Burch.** 1959. *The Principles of humane Experimental Techique.* London: Methuen. de Medicina Tradicional Área de Farmacológica. Protocolo de preparación de extracto acuoso de diversas especies vegetales para su posterior liofilizado. Lima, 32 pp.
- Steiling, W.** 1994. The hen's egg test on the chorioallantoic membrane. The ERGATT/FRAME database of *in vitro* techniques (INVITTOX) IP-96: 1-23
- Vaquero, P. & P. Gonzalez.** 1990. Métodos alternativos a la experimentación animal. *Anal Acad Med y Cir Vall.* XXVIII: 381-388.
- Vázquez, F. & M. García.** 2017. Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de extractos de pitahaya *Hylocereus undatus* *Revista Jóvenes en la ciencia*, Vol 3, Núm. 2, 2017. Universidad de Guanajuato Mexico <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/>
- Wilson, T. D. & W. F. Steck.** 2000. A modified HET_CAM assay approach to the assessment of antiirritan properties of plant extracts. *Food and Chemical Toxicology* 2000; 38: 867-872

ANEXOS

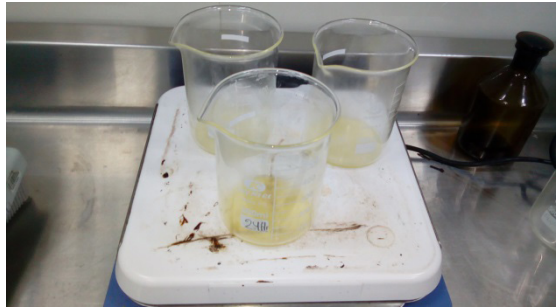


Fig. 1. Hervido del mesocarpio de "pitahaya".



Fig. 2. Prueba de solubilidad.



Fig. 3. Screening fitoquímico.

Evaluación del HET-CAM



Fig. 4. Incubación de los huevos de gallina.

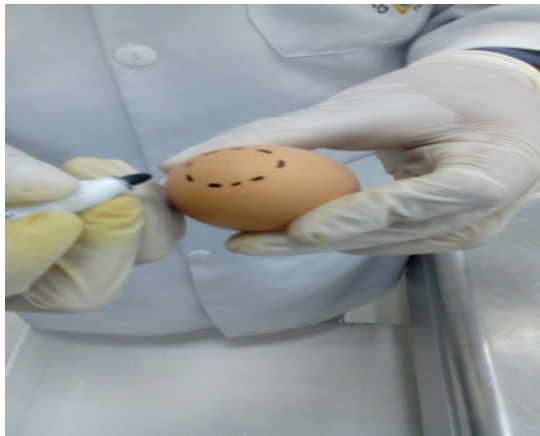


Fig. 5. Cámara de aire.

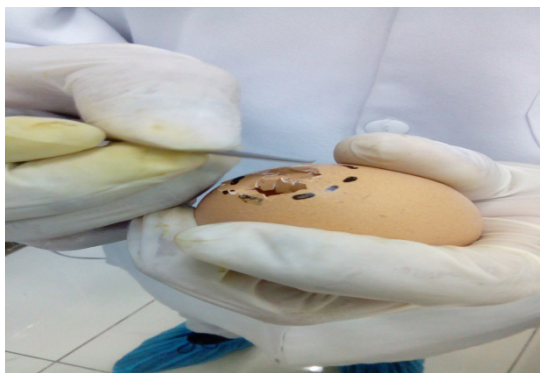


Fig. 6. Retiro de la cáscara.

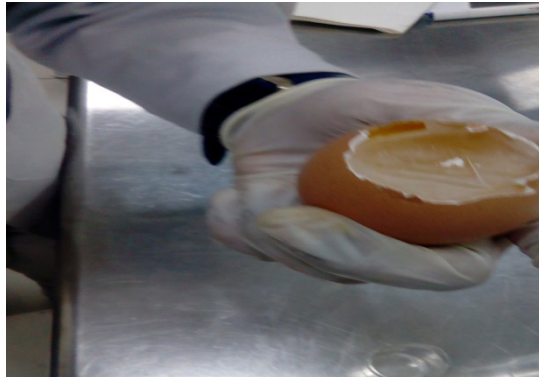


Fig. 7. Observación de la membrana interna.

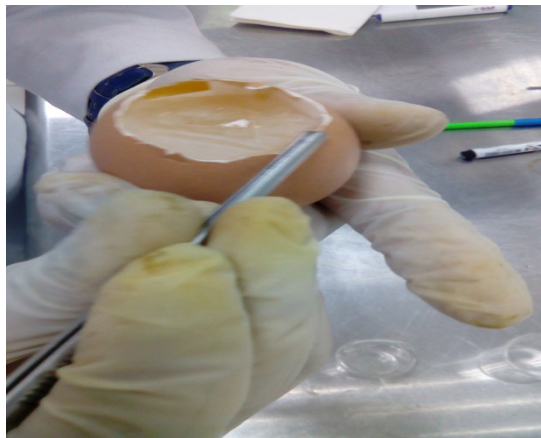


Fig. 8. Retiro de la membrana interna.

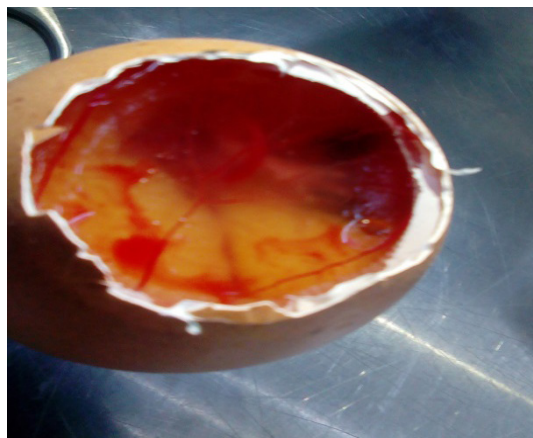


Fig. 9. Control positivo NaOH. Irritante severo.



Fig. 10. Control positivo LSS. Irritante moderado.

Muestras del gel | elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" 1% 0,5%, no irritante

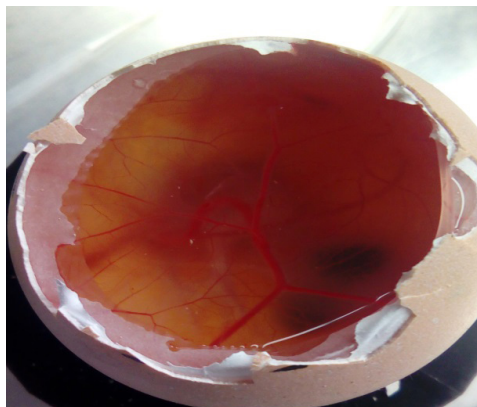


Fig. 11. Vista panorámica. No irritante.



Fig. 12. Gel elaborado con el extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" 1% 0,5%, no irritante.