

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

E.A.P DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO
ETANOLICO DEL FRUTO DE *passiflora mollissima*
(kunth) l.h.bailey “tumbo serrano” Y SU USO COMO
ACTIVO BIOLÓGICO EN INDUSTRIA
COSMETICA**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica(o)

AUTOR

Lizbeth del Rosario Churampi López

Erick Edwards Montes Manrique

ASESOR

Bertha Jurado Teixeira

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios por darme vida, salud y fortaleza para lograr todas mis metas y objetivos.

A mis amados padres Emma y Hernán por su infinito amor, sus sabios consejos, comprensión y apoyo incondicional en cada momento de mi vida

A mi hermana María por ser mi modelo a seguir, mi ejemplo de responsabilidad y superación.

A mi sobrina María Paz quien ha sido y es mi motivación y fuente de felicidad.

Lizbeth

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante, ayudándome a encarar las adversidades sin desfallecer en el intento.

A mis padres, Elsa y Erick por su apoyo incondicional, invaluable consejos, comprensión, infinito amor y ayuda en los momentos difíciles,

A mis hermanos, Alexandra y André por estar siempre presentes y compartir mis logros obtenidos.

Erick

AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora de Tesis **Q.F. Bertha Jurado Texeira** por su valioso apoyo, orientación y generosidad; por compartir sus amplios conocimientos y experiencia para desarrollar y culminar el presente trabajo.

A la Q.F. Alba Valenzuela por su gran apoyo, invalorable consejos y orientación que permitieron la realización del presente trabajo.

Al presidente y miembros del jurado por sus valiosos aportes para la mejor elaboración de esta tesis.

Presidente: Dra. Arilmi Rosa Gorriti Gutiérrez

Miembros: Dra. Augusta Isabel Córdova Rivera

Mg. Margarita Eva Lobatón Erazo

Mg. Juan Roberto Pérez León Camborda

A Corporación Belcorp por las facilidades brindadas en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	GENERALIDADES.....	3
	2.1 <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”	
	2.1.1 Características generales y distribución.....	3
	2.1.2 Identificación taxonómica.....	4
	2.1.3 Importancia económica y valor nutricional.....	5
	2.1.4 Actividad farmacológica.....	7
	2.2. Flavonoides.....	7
	2.2.1. Clasificación.....	9
	2.2.2. Actividad farmacológica.....	10
	2.3 Inflamación.....	11
	2.4 Perfil de seguridad.....	12
	2.4.1 Criterios que deben ser evaluados.....	15
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3,1	Materiales.....	16
	3.1.1. Material biológico.....	16
	3.1.2. Equipos.....	16
	3.1.3. Materiales de laboratorio.....	16
	3.1.4. Drogas y reactivos.....	17

3.2.	Métodos.....	18
3.1.1.	Recolección de la muestra.....	18
3.1.2.	Identificación de la muestra.....	19
3.1.3.	Preparación de la muestra.....	19
3.1.4.	Tamizaje farmacognóstico.....	19
3.1.5.	Análisis cromatográfico.....	22
3.1.6.	Evaluación de actividad antiinflamatoria.....	23
3.1.7.	Evaluación de perfil de seguridad <i>in vitro</i>	24
3.1.7.1.	Estudio de potencial de irritación dérmica: método Irritacion Assay System (IAS).....	24
3.1.7.2.	Estudio de potencial de irritación ocular: método HET-CAM.....	28
4.	RESULTADOS.....	31
4.1.	Tamizaje farmacognóstico.....	31
4.2.	Análisis cromatográfico.....	32
4.3.	Actividad antiinflamatoria.....	33
4.4.	Perfil de seguridad <i>in vitro</i>	34
4.4.1.	Ensayo IAS.....	34
4.4.2.	HET-CAM.....	37
5.	DISCUSIÓN.....	39
6.	CONCLUSIONES.....	42
7.	RECOMENDACIONES.....	43
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
9.	ANEXOS.....	48

RESUMEN

Passiflora mollissima (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” es una planta nativa peruana, utilizada en medicina tradicional por sus beneficios en la salud y valor nutricional. Presenta compuestos polifenólicos principalmente flavonoides; responsables de la capacidad antioxidante y mayoría de propiedades farmacológicas. Los objetivos del presente trabajo: determinar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” utilizando el modelo experimental: edema auricular inducido por TPA y su uso como activo biológico en la industria cosmética a través de pruebas de seguridad *in vitro* por el método Irritation Assay System (potencial de irritación dérmica) y el método HET CAM (potencial de irritación ocular). El extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” presentaron actividad antiinflamatoria en las dosis de 500 y 1000 µg. En las pruebas de seguridad *in vitro*, se observó ligero potencial irritante. Conclusiones, en las condiciones experimentales se demostró que el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” presentó actividad antiinflamatoria y seguridad como activo biológico en la industria cosmética.

Palabras clave: *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey, actividad antiinflamatoria, seguridad.

ABSTRACT

Passiflora mollissima (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” is a native plant of Peru, used in traditional medicine for its many health benefits and its important nutritional value. The presence of certain flavonoid polyphenolic compounds mainly responsible for the antioxidant capacity and pharmacological properties. The objectives of the present work: to determine the anti-inflammatory activity of ethanol extract of the fruit of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey "tumbo serrano" using the experimental ear model TPA induced and its use as a biological active in cosmetic industry through safety tests *in vitro* by the method Irritation Assay System (Dermal irritation potential) and the HET CAM method (Ocular irritation potential). The 20% ethanol extract of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey "tumbo serrano" showed anti-inflammatory activity at doses of 500 and 1000 ug. Tests security *in vitro*, showed slight irritant potential. In conclusion, under the experimental conditions showed that the ethanol extract of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo Serrano” presented an anti-inflammatory activity and has been proven safe for use as a biological active in the cosmetic industry.

Keywords: *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey, anti-inflammatory activity, safety tests *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

La naturaleza ha sido fuente de agentes medicinales desde el inicio de la humanidad hasta el inicio del siglo XX, donde las plantas medicinales constituyen el principal recurso terapéutico de la humanidad. En la búsqueda de la salud, el hombre ha profundizado en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales, ampliando su experiencia en el empleo de sus productos. De hecho hasta hoy gran cantidad de fármacos se siguen aislando de fuentes naturales.

Se han identificado gran número de especies con actividad terapéutica, y el Perú forma parte integral de la rica tradición de la cultura popular; donde el país por su ubicación geográfica, su gran biodiversidad de recursos naturales, que han demostrado su eficacia en el uso tradicional ¹⁻³; sin embargo muchas de ellas a pesar de ser muy empleadas todavía no poseen el respaldo científico que avale su actividad desde la perspectiva biomédica, careciendo de información científica respecto a su actividad farmacológica y toxicológica.

En la variedad de especies nativas peruanas utilizadas en medicina tradicional tenemos a *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, especie originaria de las zonas andinas de América del sur (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela). En el Perú, crece preferentemente en la sierra de los departamentos de Ancash, Junín, Moquegua y Huancavelica entre 1000 a 3500 m.s.n.m. con temperaturas que oscilan entre 8°C a 24°C. Tradicionalmente se utiliza en el tratamiento de cálculos renales, problemas estomacales y patologías urinarias ^{3,4}.

El fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” es una baya elipsoidal de 7 a 10 cm de largo, verde claro en proceso de desarrollo y completamente amarilla al madurar; pulpa carnosa, jugosa y semillas pequeñas de color negro, sabor suave, agradable, perfumado, ligeramente ácido y astringente, utilizado en la industria alimentaria en la preparación de sorbetes, licores, mermeladas, helados, jugos a partir de la pulpa congelada y saborizante para

productos lácteos. Posee alto valor nutritivo, fundamentalmente vitamina A, C y enzimas ⁵⁻⁷.

Sin embargo, hasta el presente no se han registrado estudios en el fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” sobre su actividad antiinflamatoria, por lo que este estudio aporta los primeros antecedentes de la mencionada actividad y su posible utilidad como activo biológico en la industria cosmética; con los siguientes objetivos:

- Demostrar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” mediante la técnica del edema auricular inducido por TPA.
- Demostrar la seguridad de uso del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” como activo biológico en la industria cosmética.

Hipótesis:

- El extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” posee propiedades antiinflamatorias.

II. GENERALIDADES

2.1 *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “Tumbo serrano”

2.1.1 Características generales y distribución

Passiflora mollissima (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” es una planta originaria de las zonas andinas de América del sur; distribuida principalmente en las zonas frías de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Es conocida con el nombre común de tumbo, tumbo serrano, curuba de Castilla, poro poro, purocksha, tacso¹⁻⁴

En el Perú las zonas de producción se ubican entre 1800 a 3300 m.s.n.m. de preferencia en la sierra de las regiones de Ancash, Junín, Moquegua y Huancavelica; requiere clima con temporadas altamente húmedas y secas, especialmente en valles interandinos, con temperaturas que fluctúan de 18 °C a 24 °C, cultivándose mayormente bajo lluvia en huertos familiares, enramadas o crecen en estado semi-silvestre formando cercos vivos de protección en heladas⁴.

Planta trepadora, con tendencia a ramificarse desde sus primeras etapas de crecimiento, con enredaderas vigorosas, tallo cilíndrico pubescente, pueden llegar a medir de 7 a 12 metros y hojas obovadas, trilobuladas y bordes aserrados en sus márgenes, generalmente con vellosidades pubescentes en ambas caras. Flores de pétalos rosado a rojo; presenta brácteas cilíndricas verde pubescente con tres lóbulos muy largos que llegan a medir de 6 a 10 cm. Corola formada por una fila de papilas diminutas^{4, 5, 7}.

Fruto baya oblonga u ovoide, al madurar amarillo, blanco o rojizo, de acuerdo a la variedad; dimensiones variables de 6 a 20 cm de largo, de 3 a 7 cm de diámetro y peso promedio 90 g. La pulpa formada por semillas envueltas en arilos con jugo aromático color salmón-anaranjado o rojizo; particularmente rico en niacina (3,05 mg en 100 g), alto contenido en pectinas y sabor muy agradable y agrídulce, con pH que varía de 3,5 a 4,5 según la variedad^{4, 5, 7}.

Semillas ovaladas y aplanadas, rodeadas de un arilo anaranjado succulento y comestible, marrón oscuras con puntitos amarillos dispuestos en dos hileras ^{4, 5, 7}.

2.1.2 Identificación taxonómica

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Dilleniidae

ORDEN: Violales

FAMILIA: Passifloraceae

GÉNERO: Passiflora

ESPECIE: *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey

La muestra vegetal fue identificada por el biólogo José Ricardo Campos de la Cruz (C.B.P. N° 3796), y de acuerdo al Sistema de Clasificación de A. Cronquist et al 1981. Anexo 1.

2.1.3 Importancia económica y valor nutricional

El consumo y exportación de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” es muy pequeño, debido a problemas agronómicos resulta imposible su comercialización al exterior como fruta fresca, siendo indispensable su procesamiento a pulpa congelada^{7, 8}.

En la industria el fruto se usa para preparar sorbetes, licores, mermeladas, helados, jugos a partir de la pulpa congelada, para saborizar productos lácteos. Su importancia radica en sus características de aroma y sabor: suaves, tenues y delicados, que le otorga amplias posibilidades de fruta exótica en los mercados de Europa y Norteamérica ^{5, 7}.

Respecto a su valor nutricional, se observa en la tabla 1.

Tabla N° 1. Composición nutricional de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” por 100 gr de porción comestible ⁸.

Composición	Unidades	<i>Passiflora mollissima</i>
Agua	G	82.1
Energía	Kcal	64
Proteínas	G	1.2
Grasa	G	0.5
Carbohidratos	G	15.4
Fibra	Mg	3.6
Calcio	Mg	8
Fósforo	Mg	34
Hierro	Mg	0.6
Retinol	Mcg	159
Tiamina	Mg	0.02
Riboflavina	Mg	0.11
Niacina	Mg	4.56
Ácido Ascórbico	Mg	66.7

Fuente: tablas peruanas de composición de alimentos. INS. 2009.

2.1.4 Actividad farmacológica

Investigaciones realizadas con el género *Passiflora* han demostrado diversas propiedades farmacológicas. El extracto etanólico de *Passiflora foetida* posee actividad analgésica y antiinflamatoria ⁹; el extracto en acetona del fruto de *Passiflora ligularis* Juss posee actividad antimicrobiana, antidiabética y antioxidante¹⁰; el extracto acuoso liofilizado obtenido de hojas de *Passiflora edulis* posee actividad antiinflamatoria ¹¹; el extracto etanólico de hojas y frutos de *Passiflora edulis* Sims posee actividad antihipertensiva ¹².

Estudios realizados con el fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” han demostrado que posee una elevada capacidad antioxidante y reductora al compararse con otros frutos tropicales ^{2, 13, 14, 15}. Estos estudios también han demostrado que la actividad antioxidante está relacionada con la presencia de compuestos fenólicos, entre los que destacan los flavonoides ^{2, 16}.

2.2 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos que se caracterizan por poseer un mismo elemento estructural, conocido como encadenamiento diaril-propánico, fenilcromano o benzopirano. Esta estructura es del tipo Ar-C₃-Ar o bien C₆ – C₃ – C₆ lo que viene a decir que: C₆ son anillos bencénicos (anillo A y anillo B) unidos entre sí a través de una cadena de 3 átomos de carbono que puede formar o no un tercer anillo pirano o pirona (anillo C) (figura 1). Proceden de una ruta biosintética mixta: de los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos, mientras que el B y la unidad C, proceden de la ruta del ácido shikímico^{13,14}.

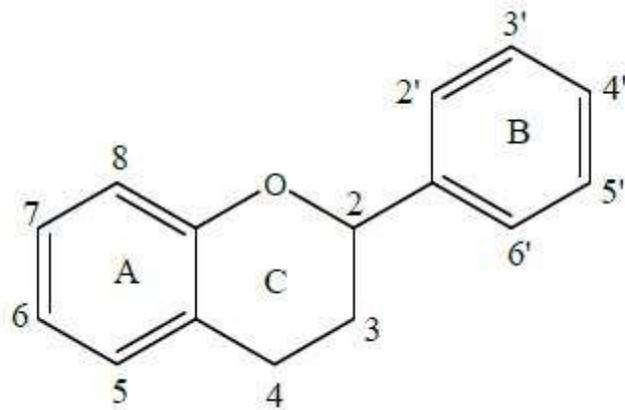


Figura 1. Esqueleto común de los flavonoides

Se pueden encontrar como agliconas y/o en mayor proporción en forma de O-heterósidos o C-heterósidos, unidos generalmente a la glucosa, también pueden unirse a ramnosa y a galactosa. La mayoría de flavonoides son O-heterósidos ¹⁴.

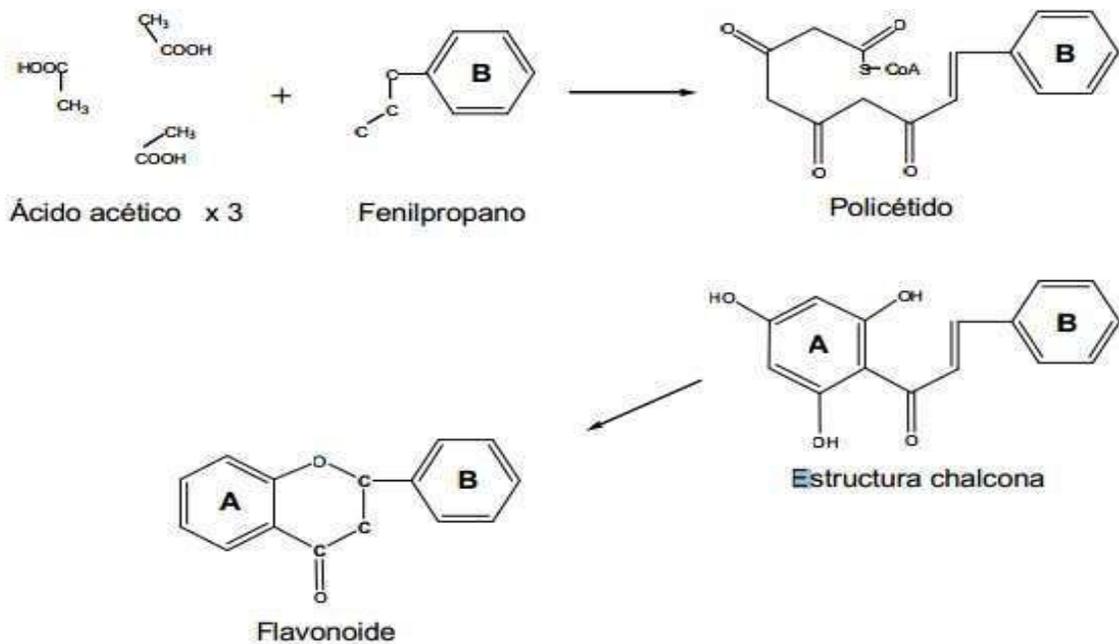


Figura N° 2. Ruta Biosintética de los flavonoides.

2.2.1 Clasificación

Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales. Al modificar el esqueleto común de los flavonoides por glicosilación, oxidación, reducción o alquilación; el núcleo genera un escaso número de estructuras básicas de las cuales se derivan la amplia gama de flavonoides entre los que se incluyen: flavanonas, flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianinas, flavanonoles, isoflavonas, chalconas y neoflavonas ^{14,17}.

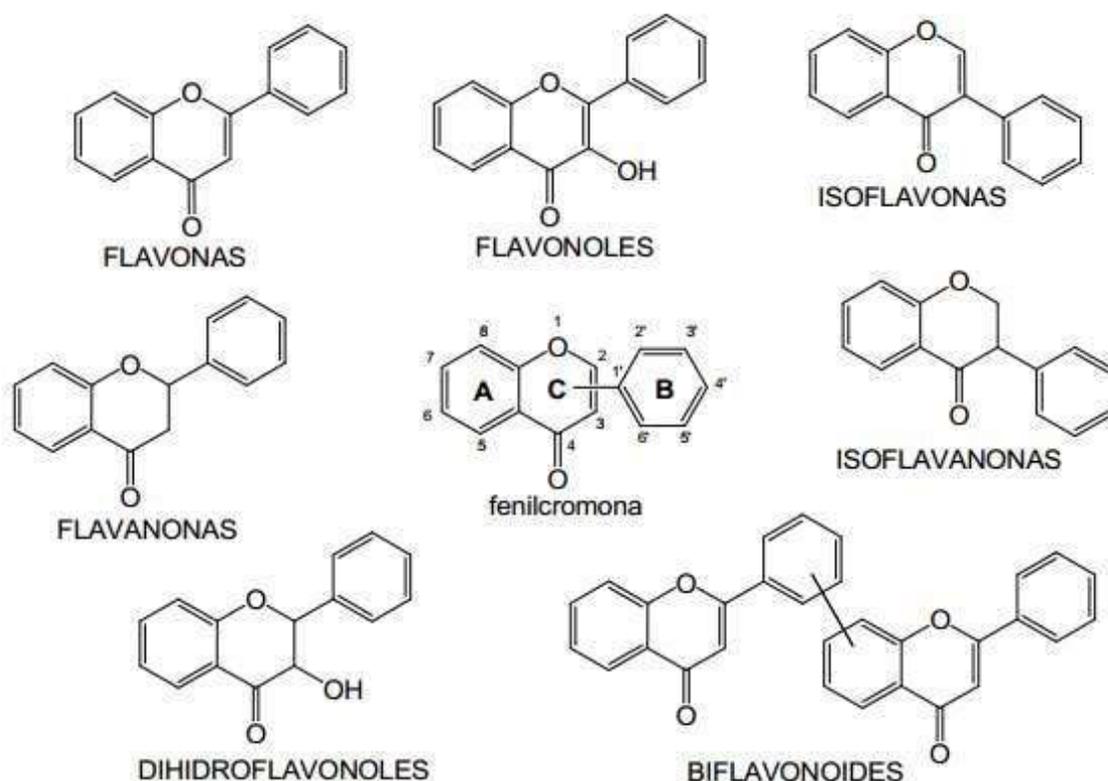


Figura N° 3. Estructura base de los flavonoides.

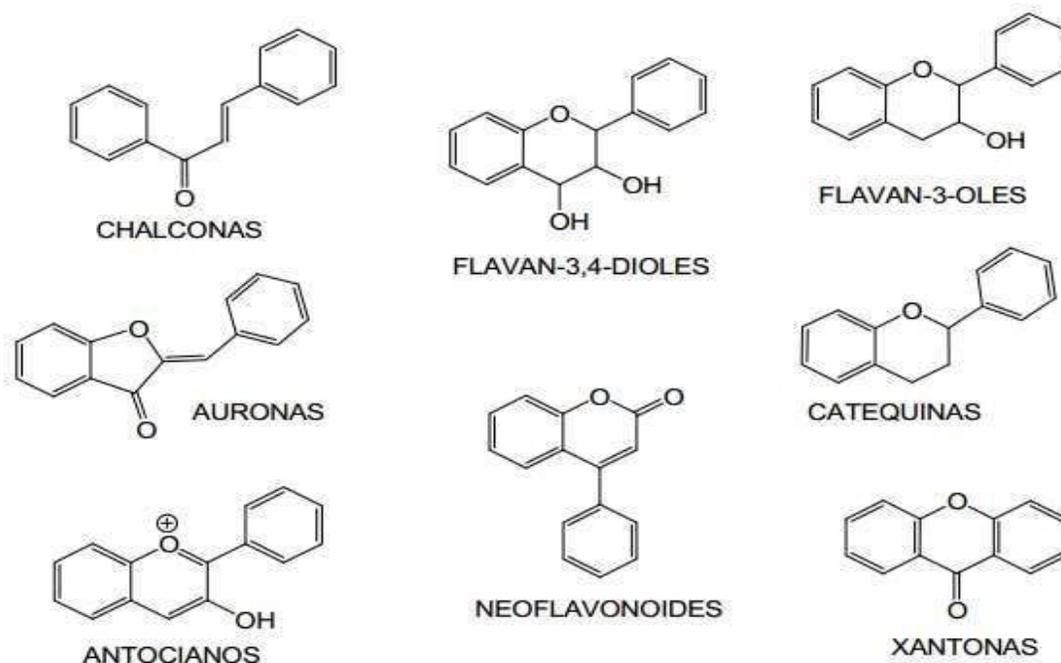


Figura N° 4. Estructura base de los flavonoides.

2.2.2 Actividad farmacológica

Los flavonoides constituyen una de las familias de compuestos naturales más interesantes por su amplia bioactividad y presencia en la dieta humana, que merecen investigación farmacológica ¹⁸.

Numerosos estudios *in vitro* han confirmado sus efectos antioxidantes, reducen la formación de radicales libres, inhiben la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas¹². Estudios *in vivo* han demostrado que los flavonoides presentan numerosas actividades farmacológicas: antianginosa, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antialérgica, antiulcerosa, hepatoprotectora y acción protectora vascular, entre otras ¹³⁻¹⁸.

2.3 Inflamación

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es liberar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y las consecuencias de la misma. La respuesta inflamatoria tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica el plasma, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares del tejido conjuntivo ¹⁸.

Las respuestas vascular y celular de la inflamación están mediadas por factores químicos procedentes del plasma o de las células que se activan por el propio estímulo inflamatorio. Estos mediadores actúan de forma aislada, secuencial o en combinación, y en fases posteriores amplifican la respuesta inflamatoria e influyen en su evolución. La inflamación termina cuando se elimina el estímulo lesivo y desaparecen o se inhiben los mediadores de la misma¹⁸.

El objetivo primario de la inflamación es localizar y erradicar el agente o sustancia nociva y reparar el tejido afectado. Con este fin, se generan reacciones que van desde una respuesta local hasta una generalizada, en las que se involucra tres etapas básicas:

- Después de un periodo transitorio de vasoconstricción arteriolar, se produce vasodilatación, que afecta inicialmente a las arteriolas y posteriormente inicia la apertura de nuevos lechos capilares en la zona de lesión. Ésta es la causa del incremento del flujo sanguíneo, que a su vez causa el enrojecimiento e incremento de calor en la zona de lesión.
- La lentificación o retraso de la circulación se debe al aumento de la permeabilidad de la microvasculatura, con salida de líquido rico en proteínas de la circulación a los tejidos extravasculares, en un proceso que se describe a continuación.
- En paralelo se inicia la orientación periférica de leucocitos, principalmente neutrófilos, a lo largo del endotelio vascular, un proceso que se denomina marginación leucocitaria. Más adelante los leucocitos se adhieren al

endotelio, de forma transitoria al principio y con mayor intensidad después, atravesando la pared vascular al cabo de un corto período y dirigiéndose hacia el intersticio. Esta migración tiene como objetivo la fagocitosis de los agentes patógenos invasores y la liberación de mediadores que contribuyen la reacción inflamatoria ¹⁷.

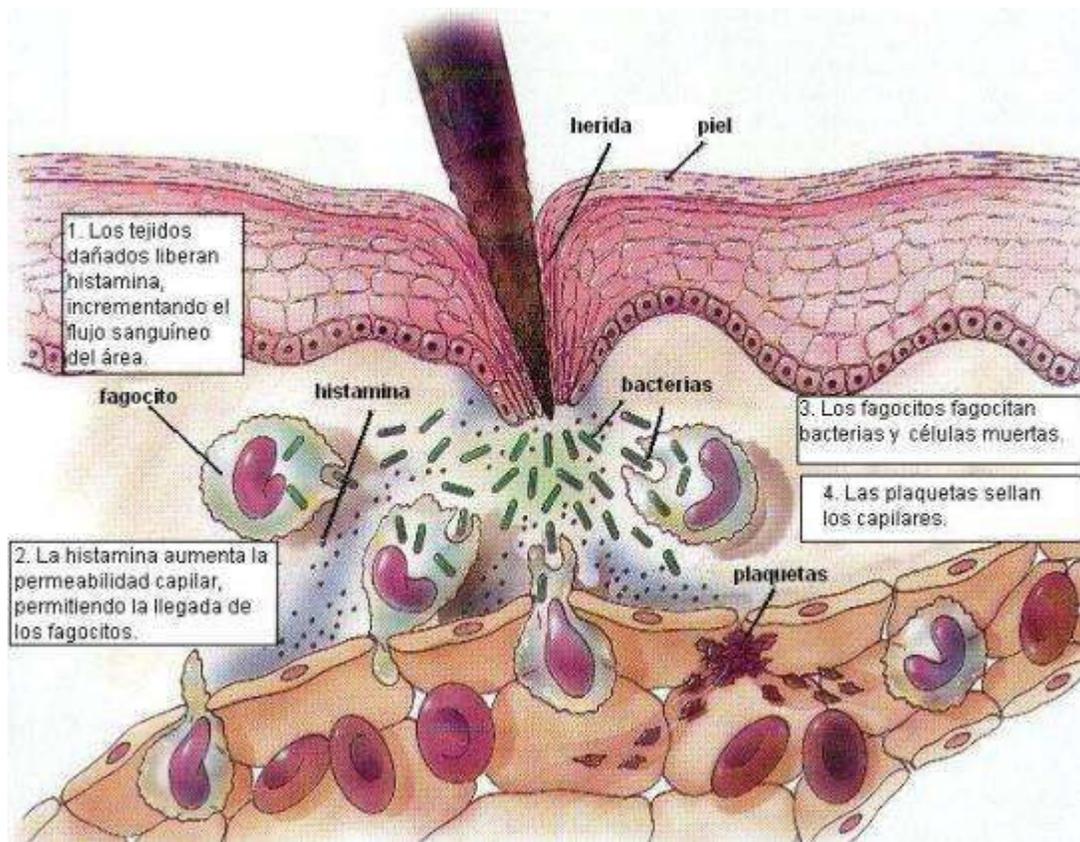


Figura N° 5. Pasos de la respuesta Inflamatoria.

2.4 Perfil de seguridad

Los productos cosméticos se formulan con un número razonablemente restringido de ingredientes. Los efectos observados en el producto terminado en gran parte dependen de sus componentes. El conocimiento de su perfil toxicológico permite

evaluar las investigaciones en productos terminados, siempre y cuando se respete su forma galénica (cosmética) y, especialmente, la asociación de ingredientes ¹⁹.

Es necesario disponer del mejor conocimiento posible para cada ingrediente, tanto en lo que se refiere a sus características, como también a sus datos toxicológicos, tomando en cuenta los riesgos potenciales relacionados al uso cosmético. Esta medida es, con seguridad, la mejor forma de evitar problemas posteriores referidos al comportamiento del producto final, durante su desarrollo o después de su ingreso al mercado ¹⁹.

Hasta hoy ha sido accesible la búsqueda de informaciones técnicas, de orden científico y normativo para la mayoría de ingredientes químicos, en lo que se refiere a las sustancias obtenidas de extractos naturales, muchos factores están asociados desde su cultivo hasta su preparación farmacognóstica, actores que pueden conferir a las sustancias presentes un enorme grado de contrastes, cuyos valores pueden interferir en la evaluación toxicológica del producto terminado¹⁹.

La mayoría de informes en la evaluación del riesgo potencial de un producto cosmético, resulta del conocimiento de los ingredientes que componen su fórmula, con ellos pueden ser responsables directamente de cualquier efecto sistémico y buena parte del riesgo alergénico. Sin embargo, la fórmula del producto terminado puede interferir a medida que facilita la absorción total o parcial de sus ingredientes, siendo responsable también de posibles sinergismos resultantes de la asociación de ingredientes ¹⁹.

Por lo tanto, el conocimiento disponible de los ingredientes puede no ser suficiente para prevenir un efecto indeseable en el consumidor meta. Además de los componentes, se deben evaluar otros parámetros involucrados, tales como: el uso del producto, área de aplicación, si el uso es diario, prolongado y repetido, entre otros. Variando el riesgo potencial en cada uno de los casos ¹⁹.

El evaluador debe observar todos estos parámetros, garantizando, de la mejor manera posible, la seguridad del consumidor en condiciones normales o razonablemente previsibles del uso de un producto cosmético ¹⁹.

Debido a la evolución técnico científica, en la década del 80 se empezaron a desarrollar modelos experimentales alternativos para el área cosmética, en sustitución al uso de animales de laboratorio. Inicialmente, se desarrollaron metodologías para responder correctamente a las necesidades de investigación en farmacología, donde se sabe que el comportamiento animal puede ser distinto del humano. También se contemplaron los métodos alternativos para evaluar sus efectos toxicológicos ¹⁹.

Algunos de estos métodos han sido utilizados desde tiempos remotos, particularmente en el área de la mutagenicidad, donde se desarrollaron numerosos tests, validados e integrados en las directivas internacionales, tales como OCDE (Organización para Cooperación y Desarrollo Económico). También se utilizaron, con éxito, para demostrar el mecanismo de acción específico, siendo útiles y predictivos en referencia a sistemas biológicos simples, por ejemplo: estudios en microorganismos, células, tejidos y/u órganos de animales y humanos ¹⁹.

La dificultad en el uso de métodos alternativos reside en la evaluación de la reactividad de sistemas más complejos, como, por ejemplo, en la práctica, el caso de la evaluación del riesgo toxicológico. Es necesario tener acceso a una batería de tests complementarios, para que el conjunto de ellos ofrezca resultados con los mismos niveles científicos e información, con relación a los obtenidos con los modelos en animales. Tales modelos alternativos deben validarse, de acuerdo a procedimientos internacionales en el área de aplicación, para que el medio científico y los organismos reguladores los reconozcan ¹⁹.

Se han realizado numerosos esfuerzos para disminuir el uso y sufrimiento de animales ¹⁹.

En 1984, el Gobierno Británico concedió fondos para el desarrollo de métodos alternativos a *FRAME – Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* que, desde 1983, edita una revista internacional titulada *ATLA – Alternatives to Laboratory Animals*. En 1994, se inauguró el *ECVAM – European Committee for Validation of Alternative Methods* – institución de la Comisión Europea encargada de promover y validar técnicas y metodologías destinadas a la sustitución de los ensayos en animales. Algunas instituciones, como *CTFA – Cosmetic, Toiletries and Fragrance Association*, *IRAG – Interagency Regulatory Alternatives Group*, *FDA – Food and Drug Administration* y *Alternatives to Animal Testing*, John Hopkins University, Baltimore – EE.UU., constituyen referencias para acelerar la estandarización y armonización de metodologías *in vitro* ¹⁹.

2.4.1. Criterios que deben ser evaluados

Los riesgos a evaluar en ingredientes y productos cosméticos son del tipo irritativo, alergénico y sistémico; este último esencialmente por medio de absorción oral o penetración ¹⁹.

Numerosos tests han sido aceptados y utilizados en la evaluación del riesgo de provocar irritación. Sin embargo, no todos han sido validados, ya que los resultados obtenidos fueron divergentes entre ellos ¹⁹.

Basándose en un banco de datos consistente, un investigador puede interpretar los resultados obtenidos para realizar la comparación entre productos de la misma categoría¹⁹.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1 Material biológico

- *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”: fruto
- Ratones albinos machos (cepa Balb/c) de 6 – 8 semanas de edad, con peso promedio de 25 ± 2 g.
- Huevos raza Ross-amarilla 10 días de fertilización.

3.1.2 Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo PB1501-S Precisión: 0.1 g □
- Espectrofotómetro UV- VIS Serie 7000 Beckman.
- Incubadora convección de aire forzado a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ IF 30 Plus - Memmert.
- Incubadora Ehret de rotación.
- Lámpara de luz fría
- Lámpara UV
- Licuadora eléctrica (Oster)
- Potenciómetro Mettler Toledo SevenGo Pro SG8
- Termómetro

3.1.3 Materiales de laboratorio

- Embudo de vidrio Pyrex
- Gradillas
- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Micropipeta Brand
- Papel kraft
- Papel de filtro Whatman N° 3

- Parafilm o plástico envolvente.
- Pinzas plásticas de punta roma
- Pipeta graduada 5 mL
- Probetas graduadas 100 mL
- Tips para micropipeta de 25 a 150 μ L
- Tubos de ensayo Kimax
- Vasos de precipitación 250 mL
- Vasos de precipitación 500 mL

3.1.4. Drogas y reactivos

- Acetona (Merck)
- Ácido clorhídrico (Merck)
- Etanol (Merck)
- Hidróxido de amonio
- Hidróxido de sodio
- Indometacina
- Kit Irritacion (*in vitro* International)
- Metanol (Merck)
- Reactivo de Antrona
- Reactivo de Bortranger
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Gelatina
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Molish
- Reactivo de Ninhidrina

- Reactivo de Rosenhein
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo Vainillín sulfúrico
- Solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.
- Solución de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%
- Solución de Hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N
- Tricloruro férrico
- 12-0-Temadecanoil Forbol-13-Acetato (Sigma Aldrich)

3.2 MÉTODOS

La marcha fitoquímica y ensayos preliminares se ejecutaron en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Los estudios de actividad antiinflamatoria se realizaron en los laboratorios de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y los estudios de seguridad se realizaron en los Laboratorios de Seguridad *in vitro* de Belcorp (Belstar S.A).

Adicionalmente, se realizó la determinación de toxicidad aguda dermal DL 50 en el Centro de información, control toxicológico y apoyo a la gestión ambiental – CICOTOX de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. **Anexo N° 2.**

3.2.1 Recolección de la muestra

Se recolectaron 5 kilos de frutos de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” en el mes de diciembre de 2010 en el distrito de San Mateo de Otao, provincia de Huarochirí, departamento de Lima ubicado a una altitud aproximada de 3000 m.s.n.m. La muestra recolectada se envolvió en papel kraff y se embolsó en cajas de cartón con su respectivo rótulo.

3.2.2 Identificación de la muestra

Una parte de la planta con hojas y flores fue entregada al biólogo José Ricardo Campos De La Cruz (C.B.P. 3796) para la identificación taxonómica, según el sistema de clasificación A. Cronquist (1988).

3.2.3 Preparación de la muestra

Se procedió a la selección de la muestra y lavado del fruto. Posteriormente se retiró el epicarpio con mucho cuidado. Para obtener el jugo, se pasó la pulpa por un colador para separarlo de las semillas. En un frasco de vidrio ámbar se agregó 200 mL del jugo obtenido y 800 mL de alcohol de 96° (extracto al 20% v/v) se maceró por 5 días, con agitación periódica para optimizar la extracción de los metabolitos primarios y secundarios a temperatura ambiente.

3.2.4. Tamizaje farmacognóstico

Se utilizó para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos en la planta, basado en la aplicación de pruebas de coloración y precipitación según Gorriti et al ²⁰.

1. Determinación de azúcares

Reacción de Molish

A 1 mL del extracto etanólico se añadió 1 mL de **solución reactivo (A)** con 11 gotas de H₂SO₄ concentrado. La formación de anillo violeta indica presencia de azúcares.

Reacción de Antrona

A 1 mL del extracto etanólico se añadió II gotas de solución reactivo por las paredes del tubo de ensayo. La coloración azul verdosa en la zona de contacto indica presencia de azúcares.

2. Determinación de taninos

Reacción de cloruro férrico

A 1 mL del extracto etanólico se agregó III gotas de cloruro férrico, la coloración negra azulada indica que los taninos pertenecen a los derivados del ácido pirogálico, mientras que la coloración verde indica que derivan de la catequina.

Reacción de gelatina

A 1 mL del extracto etanólico se agregó III gotas de reactivo de gelatina. La formación de precipitado blanco indica presencia de taninos.

3. Determinación de aminoácidos libres

Reacción de ninhidrina

A 1 mL del extracto etanólico se agregó III gotas de reactivo de ninhidrina. La coloración violácea indica presencia de aminoácidos libres.

4. Determinación de flavonoides

Reacción de Shinoda

A 1 mL de extracto etanólico se agregó limaduras de magnesio y se añadió III gotas de HCl concentrado.

5. Determinación de triterpenoides y esteroides

Reacción de Lieberman-Burchardat

A 1 mL de extracto etanólico se agrega III gotas de reactivo de Lieberman Burchardat. Su coloración verde o azul verdoso indica presencia de núcleo esteroidal o triterpenoidal.

6. Determinación de quinonas

Reacción de Borntrager

A 1 mL de extracto etanólico se agrega NaOH 5% en caliente, se enfrió y aciduló con HCl 10%, se añadió benceno, agitó y dejó en reposo. Se observó la separación de la fase bencénica a la cual se añadió NH_4OH , la coloración roja indica la presencia de antraquinonas.

7. Determinación de alcaloides

Reacción de Dragendorff

A 1 mL del extracto etanólico se agrega III gotas de solución reactivo. La formación de precipitado rojo ladrillo indica presencia de alcaloides.

Reacción de Mayer

A 1 mL de extracto etanólico previamente acidulada se agrega III gotas de solución reactivo. La formación de precipitado blanco indica presencia de alcaloides.

8. Determinación de antocianinas y flavonoides catéquicos

Reacción de Rosenheim

A 1 mL de extracto etanólico se agrega III gotas de reactivo Rosenheim. Coloración rojo oscura indica resultado positivo.

9. Determinación de glicósidos

Reacción de Vainillín sulfúrico

A 1 mL de extracto etanólico se agrega III gotas de reactivo vainillina y 0.5 mL de ácido sulfúrico. Anillo de color violáceo en interfase indica resultado positivo.

3.2.5 Análisis cromatográfico

Realiza cromatografía en papel descendente con papel Whatman N° 3, el extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” se aplica en banda a lo largo del papel cromatográfico. Los papeles se colocaron en una cámara de cromatografía. El sistema de solvente: BAW (n-buOH – HOAc – H₂O, 4:1:5) v/v. Revelador Luz UV y vapores de amoniacó.

3.2.6 Evaluación de actividad antiinflamatoria (método del edema auricular)

Determina el estudio farmacológico de la actividad antiinflamatoria (edema auricular) por vía tópica de la muestra mediante los procedimientos descritos en el Manual CYTED ²⁴.

Para el ensayo se utilizan 30 ratones albinos machos (Cepa Balb/c) de 6-8 semanas de edad con peso promedio de 25 ± 2 g; provenientes de las instalaciones del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS). El total de animales se distribuyen en 5 grupos de 6 animales por tratamiento ($n = 6$), siendo un grupo el control.

Se utiliza TPA (12-0-temadecanoil forbol-13 acetato) como agente irritante aplicando en el pabellón auditivo del ratón disuelta en acetona (1 mg/8mL), como agente antiinflamatorio se utiliza la indometacina en dosis de 500 μ g por oreja. La prueba incluye cinco ensayos según el siguiente diseño experimental. Tabla N° 2.

Tabla 2. Ensayos de experimentación del extracto etanólico 20% de *Passiflora mollissima* – Método del edema auricular.

Grupo	Animales	Dosis (μ g/oreja)
Control	6	0
Indometacina	6	500
Dosis 1	6	250
Dosis 2	6	500
Dosis 3	6	1000

Se administra el agente irritante TPA (2,5 μ g/oreja) disuelto en acetona e indometacina (500 μ g/oreja) o con el extracto a tratar a diferentes dosis (250, 500 y 1000 μ g/oreja).

Se aplica tópicamente sobre la superficie externa e interna de la oreja derecha del ratón (volumen total: 20 µL/oreja, 10 µL/cara). La oreja izquierda se emplea como control. Transcurridas cuatro horas después de la aplicación, se sacrifican los animales por dislocación cervical y con ayuda de un sacabocados, se corta una porción circular (7mm de diámetro) de la oreja inflamada e igualmente otra de la oreja no inflamada, se pesan para determinar por diferencia el edema como delta (Δ = Variación) de peso (Pt - Pnt). Los resultados se expresan como edema producido y porcentaje de inhibición frente al grupo control utilizando la siguiente expresión:

Porcentaje de inhibición:

$$\frac{(\text{Pt} - \text{Pnt}) \text{ Control} - (\text{Pt} - \text{Pnt}) \text{ Tratamientos}}{(\text{Pt} - \text{Pnt}) \text{ Control}} \times 100$$

Donde:

Pt = Peso de la sección de la oreja tratada

Pnt = Peso de la sección de la oreja no tratada

3.2.7 Evaluación de perfil de seguridad *In vitro*

3.2.7.1 Potencial de Irritación dérmica: método irritation assay System (IAS)

Se inicia con la preparación de los reactivos y materiales a utilizar. Se coloca la solución hidratante a 25°C en incubadora 1 a 2 horas antes de iniciar el ensayo. Se retiran de refrigeración las cajas que contienen los 24 pozos 30 a 45 minutos antes de iniciar el ensayo y colocan en incubadora a 25°C. Se toma la muestra en 4 volúmenes: 50 µL, 75 µL, 100 µL y 125 µL (extracto etanólico 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) y se colocan directamente en los discos que contienen las membranas. Se adiciona lentamente 600 µL del activador a la botella de 30 mL del Blanking Buffer.

Se procede a rotular las cajas de 24 pozos, los pozos con las esquinas romas hacia el lado izquierdo. En la siguiente figura se observa la distribución de muestras, así como los volúmenes que deben tomarse en cada caso.

	1	2	3	4	5	6
A	BO 125 µL	B1 50 µL	S1 50 µL	B2 50 µL	S2 50 µL	B3 50 µL
B	Cal 0 125 µL	B1 75 µL	S1 75 µL	B2 75 µL	S2 75 µL	B3 75 µL
C	Cal 1 125 µL	B1 100 µL	S1 100 µL	B2 100 µL	S2 100 µL	B3 100 µL
D	Cal 2 125 µL	B1 125 µL	S1 125 µL	B2 125 µL	S2 125 µL	B3 125 µL

	1	2	3	4	5	6
A	S3 50 µL	B4 50 µL	S4 50 µL	B5 50 µL	S5 50 µL	BO 125 µL
B	S3 75 µL	B4 75 µL	S4 75 µL	B5 75 µL	S5 75 µL	Cal 3 125 µL
C	S3 100 µL	B4 100 µL	S4 100 µL	B5 100 µL	S5 100 µL	QC1 125 µL
D	S3 125 µL	B4 125 µL	S4 125 µL	B5 125 µL	S5 125 µL	QC2 125 µL

Figura 6. Distribución de muestras en plato de 24 pozos.



Pozos con Blanking buffer y disco de membrana traslúcido.



Pozos con agente reactivo y discos de membrana rosada.

Donde:

Cal0/Cal1/Cal2/Cal3: calibradores

B1/B2/B3/B4/B5: blancos

S1/S2/S3/S4/S5: muestras (extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”)

QC1/QC2: controles de calidad.

Se adiciona 1250 μ L de agente reactivo a las celdas asignadas como: Cal0/Cal1/Cal2/Cal3/QC1/QC2 y muestras: S1, S2, S3, S4 y S5.

Se adiciona 1250 μ L del Blanking Buffer a las celdas asignadas como: BO y Blancos: B1, B2, B3, B4 y B5.

Se mide 125 μ L de Cal0 y se coloca en un disco con membrana “blanca” y se coloca en la celda asignada como BO. Repite para el segundo pozo BO.

Se mide 125 μ L de Cal0, Cal1, Cal2, Cal3, QC1 y QC2 y se coloca en los discos de membrana “rosada”. Los discos de membrana se colocan en sus respectivas celdas.

Se cubre la placa de cultivo con un film plástico y se llevan a incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas \pm 30 minutos.

Posterior a este periodo se retiran los platos de la incubadora, se retiran las tapas y cubiertas de los platos. Se remueven uno a uno los discos con membrana con ayuda de una pinza, se verifican que las membranas estén intactas. Se agitan los pozos con ayuda de los palillos de madera que trae el kit y/o se suspenden los precipitados en cada una de las celdas. Se utiliza un palillo por muestra, empezando por el de menor concentración. En el caso de los calibradores, se utiliza un palillo por pozo. Se debe evitar cualquier contaminación que pueda alterar el ensayo. Las celdas con los blanking buffer no necesitan agitarse.

Tabla N° 3. Relación entre el valor equivalente de Irritación Humana (HIE) con la clasificación de Irritación por el Método de Irritación Dérmica.

HUMAN IRRITANCY EQUIVALENT (HIE) SCORE	CLASIFICACIÓN PREDICTIVA Irritación dérmica
0.0 – 0.90	No irritante
0.91 - 1.20	No irritante/Irritante
1.21 - > 5.00	Irritante

3.2.7.2 Potencial de irritación ocular: método HET – CAM

Se utilizaron 18 huevos fértiles de gallina raza Ross – amarilla. Previo al estudio, los huevos se incuban por 10 días en un sistema de rotación y control de temperatura y humedad (37 ± 2 °C/ 60 ± 5 % HR). Al cabo de este tiempo se retiraron de la cámara de incubación para realizar el ensayo. La revisión externa del huevo con ayuda de la lámpara de luz fría para identificar la cavidad o “luz” que se abre para realizar el ensayo. Con ayuda de un bisturí se realiza un pequeño orificio inicial, y se rompe cuidadosamente el cascarón del huevo de manera que quede expuesta la primera membrana del huevo de color blanco. Figura 8.

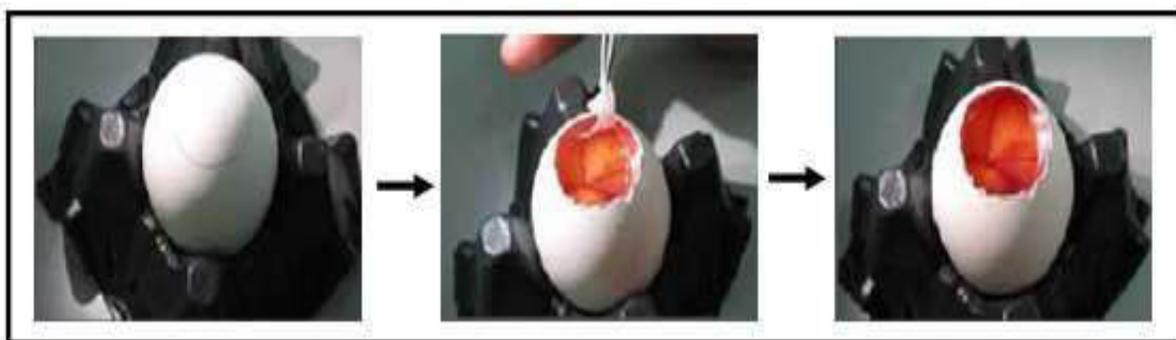


Figura 8. Tratamiento de membrana corioalantoidea.

Se lavó la primera membrana con NaCl al 0.9% y con ayuda de pinzas de plástico con punta roma se rompe con mucho cuidado y lentamente la membrana y retira de manera que la membrana corioalantoidea que es de

interés quede expuesta. Sobre la membrana expuesta se adiciona 300 µL de la muestra a evaluar (extracto etanólico 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey) y se deja en contacto por 5 minutos, durante este tiempo de exposición se anota el tiempo en segundos de la aparición de cualquiera de los fenómenos de hemorragia, coagulación o lisis vascular.

El ensayo se realiza con concentraciones de la muestra al 100 %, 10 % y 1 % cuyas diluciones se realizan con solución salina al 0.9 %; un control negativo (solución salina NaCl 0.9 %), control positivo 1 (hidróxido de sodio 0.1 N) y control positivo 2 (dodecil sulfato de sodio 1 %). El ensayo se realiza por triplicado para cada grupo según el siguiente diseño experimental.

Tabla 4. Ensayos de experimentación extracto etanólico 20 % de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey - HET – CAM

Grupo	Huevos	Dosis (µL)
Control negativo	3	300
Control positivo 1	3	300
Control positivo 2	3	300
Concentración 100 %	3	300
Concentración 10 %	3	300
Concentración 1 %	3	300

Se determina el IS por medio de la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{301 - \text{sec H}}{300} .5 + \frac{301 - \text{sec L}}{300} .7 + \frac{301 - \text{sec C}}{300} .9$$

Donde:

IS: irritation Score.

Sec: tiempo en segundos de aparición de efecto

H: hemorragia

L: lisis

C: coagulación

La severidad de la reacción se establece por la determinación del valor ITC. Con esta información se ubica el producto en las siguientes tablas de clasificación.

Tabla 5. Clasificación de irritación Het-cam. Irritation score (IS).

CLASIFICACIÓN	INTERVALOS IS SCORE	
	MÍNIMO	MÁXIMO
Mínimo	0.0	0.9
Ligero	1.0	4.9
Moderado	5.0	8.9
Severo	9.0	21.0

Tabla 6. Clasificación con base a la severidad de la reacción o daño en CAM. ITC (Threshold concentration)

CLASIFICACIÓN	IS OBTENIDO CON PRODUCTO AL 10%	ITC
Irritante ligero	< 10	> 10%
	< 16	ITC entre 2.5 y 10%
Irritante moderado	> 16	ITC > 10%
	< 16	ITC > 10%
Irritante	< 16	ITC entre 1.0 y 2.5%
	> 16	ITC entre 2.5 y 10%
Irritante severo	N/A	ITC < 1%
	> 16	ITC entre 1.0 y 2.5 %

La clasificación final se obtiene por comparación con la severidad de la reacción.

IV. RESULTADOS

4.1 Tamizaje farmacognóstico

El tamizaje farmacognóstico determinó mayor cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides en el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Estudio farmacognóstico del extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”.

REACCIÓN / REACTIVO	RESULTADO	METABOLITO
Rvo. Molish	++	Carbohidratos
Rvo. Antrona	+	Carbohidratos
Rvo. Tricloruro férrico	+++	Compuestos Fenólicos (Taninos)
Rvo. Gelatina	-	-
Rvo. Ninhidrina	++	Aminoácidos libres
Rvo. Shinoda	+++	Flavonoides
Rvo. Lieberman – Bucharat	-	-
Rvo. Bortranger	+	Antraquinonas
Rvo. Dragendorff	+++	Alcaloides
Rvo. Mayer	++	Alcaloides
Rvo. Rosenheim	++	Antocianinas y Flavonoides
Rvo. Vainillín sulfúrico	+++	Glicósidos

Legenda: Ausente (-), escaso (+), moderado (++), abundante (+++)

4.2 Análisis cromatográfico

Al revelar la cromatografía se obtuvo los siguientes resultados:

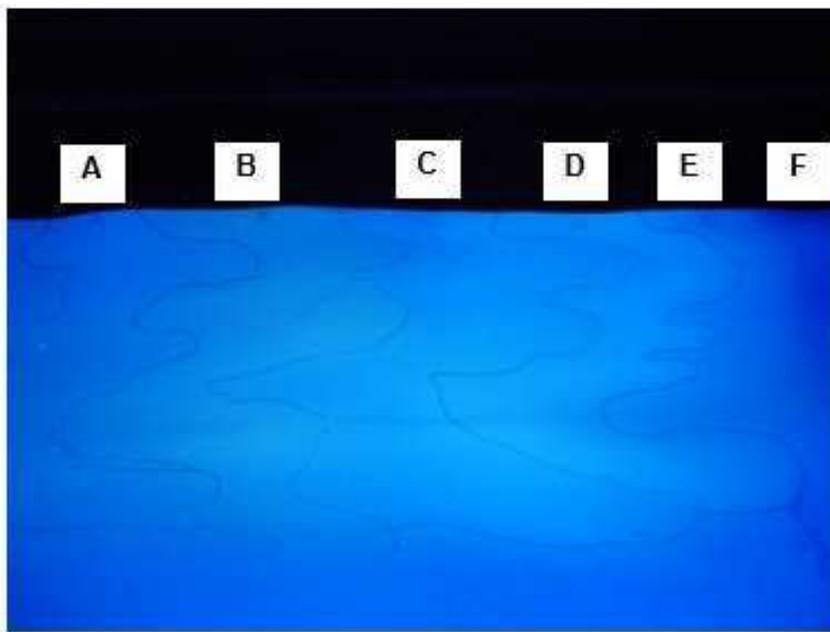


Figura 9. Cromatografía en papel del extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, sistema de solventes: BAW (n-buOH – HOAc - H₂O, 4:1:5) v/v, revelador: Luz UV.

Tabla 8. Coloración de las bandas utilizando luz UV como revelador.

	SIN NH ₃	CON NH ₃
Banda A	Naranja fluorescente	Sin cambios
Banda B	Naranja	Se intensifica el color
Banda C	Celeste	Se intensifica el color
Banda D	Amarillo verdosa	Sin cambios
Banda E	Naranja	Se intensifica el color
Banda F	Celeste fluorescente	Sin cambios

4.3 Evaluación de actividad antiinflamatoria (Método de edema auricular)

La muestra analizada presentó actividad antiinflamatoria en el modelo estudiado, a las dosis de 500 y 1000 μg de muestra/oreja, presentando diferencias significativas respecto al control. Los datos se muestran en la siguiente tabla y grafico respectivamente.

Tabla 9. Resultado de la Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”.

GRUPO	DOSIS (μg /Oreja)	EDEMA (mg)	% INHIBICIÓN	DIFERENCIA ESTADISTICA
Control	-	18,35 \pm 1,35	-	-
Indometacina	500	5,1 \pm 0,5	74,58	P < 0,05
E1	250	12,6 \pm 0,6	32,79	P < 0,05
E2	500	7,5 \pm 0,5	61,5	P < 0,05
E3	1000	4,45 \pm 0,77	78,62	P < 0,05

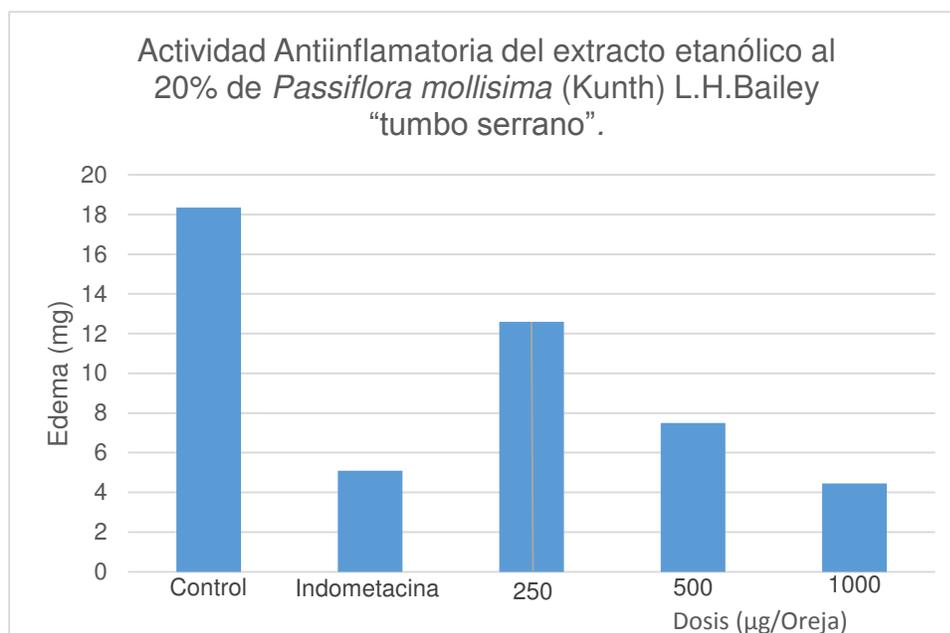


Figura 10. Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, sobre el edema auricular inducido por TPA.

4.4 Evaluación de perfil de seguridad *in vitro*

4.4.1 Ensayo Irritation Assay System

El potencial de irritación dérmica de una muestra se expresa como “Human Irritancy Equivalent (HIE)”. Las puntuaciones o “scores” obtenidos en los resultados se definen por comparación del incremento de la densidad óptica (OD₄₅₀) producida por el material de prueba versus la curva estándar que se construye con la medida del incremento de la OD producida por un set de calibradores, que han sido seleccionados por su potencial irritante documentado en una serie de investigaciones *in vivo*.

A continuación se muestran los datos obtenidos de las muestras evaluadas, soluciones de calibrador y controles de calidad.

Tabla 10. Clasificación de la irritación dérmica para cada muestra evaluada.

MUESTRAS	OD	OD BLANCO	OD NETO	SCORE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN DE IRRITACIÓN	CALIFICACIÓN
50 µL	247	-2	249	0.96	No irritante/Irritante	Calificado
75 µL	251	-1	252	0.97	No irritante/Irritante	Calificado
100 µL	256	-1	257	0.99	No irritante/Irritante	Calificado
125 µL	249	1	248	0.96	No irritante/Irritante	Calificado

Tabla 11. Valores de las soluciones del calibrador.

MUESTRAS	OD	SCORE IRRITACIÓN	RANGO LÍMITE (OD)	CALIFICACIÓN
Cal 0	78	0.00	0 – 100	Rango calificado
Cal 1	259	1.00	60 – 260	Rango calificado
Cal 2	530	2.00	330 – 886	Rango calificado
Cal 3	920	4.00	810 – 1430	Rango calificado

Tabla 12. Valores de las soluciones de Control de Calidad.

MUESTRAS	OD	SCORE IRRITACIÓN	RANGO LÍMITE (OD)	CALIFICACIÓN
QC 1	135	0.52	0.11 - 0.95	Rango calificado
QC 2	809	3.43	0.94 - 3.60	Rango calificado

Tabla 13. Resultado de Irritación dérmica del Extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	HIE SCORE	CLASIFICACIÓN PREDICTIVA Irritación Dérmica
Extracto etanólico al 20% de <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”.	0.99	No irritante/Irritante.

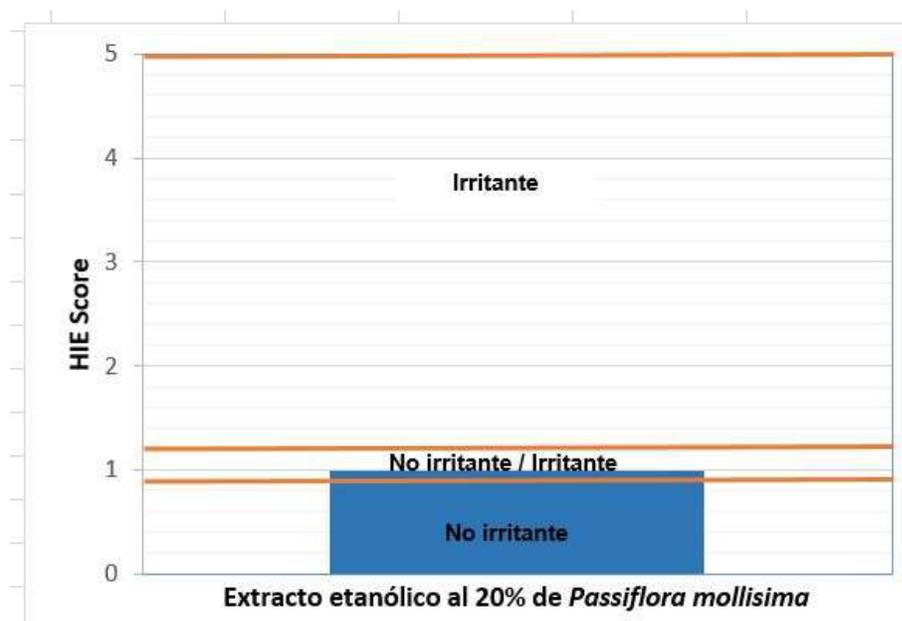


Figura 11. Score de Irritación Dérmica (HIE). Método IAS Dérmico. Extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”.

4.4.2 Estudios de potencial de irritación ocular por el método HET – CAM.

Se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 14. Cálculo de Irritation Score (IS) del extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey en concentración del 100%, 10% y 1%.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	H	L	C	IS	Desv est	Promedio
Extracto etanólico de <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey 100%	301	262	65	7.99	0.7	7.9
	301	279	80	7.14		
	301	211	87	8.52		
Extracto etanólico de <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey 10%	301	301	301	0	0	0
	301	301	301	0		
	301	301	301	0		
Extracto etanólico de <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey 1%	301	301	301	0	0	0
	301	301	301	0		
	301	301	301	0		

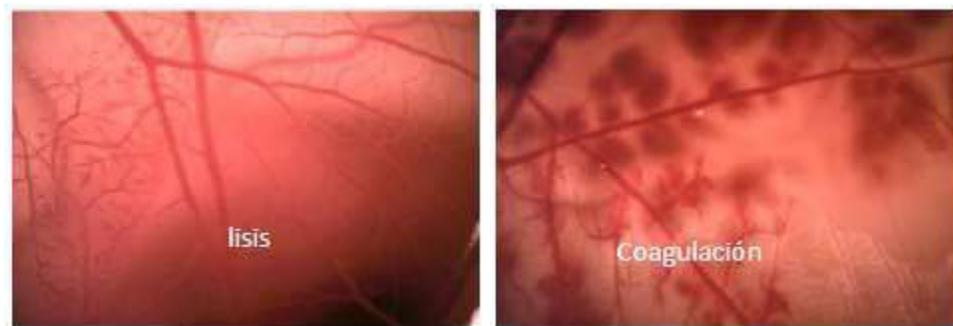


Figura 11. Efectos producidos por el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” en concentración del 100%.

Tabla 15. Resultados de la clasificación de irritación en Het-cam del extracto etanólico de *Passiflora mollissima* en concentración del 100%, 10% y 1%.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	IRRITATION SCORE (IS)	CLASIFICACIÓN PREDICTIVA Irritación Ocular (IS)
Extracto etanólico de <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey al 100%	7.9 ± 0.7	Irritante moderado (Principal efecto: coagulación)
Extracto etanólico de <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey al 10%	No se registran daños	Irritante mínimo
Extracto etanólico de <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H.Bailey al 1%	No se registran daños	Irritante mínimo
ITC: El ITC indica que diluciones iguales o por debajo del 10% el extracto no afecta la condición de la membrana corioalantoidea.		
CLASIFICACIÓN FINAL: Considerando los valores IS y el valor ITC el extracto evaluado se clasifica como Irritante ligero.		

V. DISCUSIÓN

El tamizaje farmacognóstico permitió determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos del extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, en la tabla 7 se muestran los resultados de ésta, evidenciándose la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides principalmente. Los resultados obtenidos se relacionan con el estudio realizado por **Rojano, B., et al**⁶, en el que determinaron la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos mediante métodos espectrofotométricos, así como la capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba).

Luego de la determinación de los constituyentes químicos presentes se procedió a realizar el análisis cromatográfico preliminar en papel descendente, utilizando el sistema de solventes BAW: n-buOH – HOAc – H₂O (4:1:5), debido al color de la fluorescencia que desarrollan a la luz UV, que se intensifica o cambia con exposición de vapores de amoníaco, indicó la presencia de flavonoides, esta metodología fue desarrollada por **Lock, O**²⁶.

El extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, fue evaluado utilizando el modelo de edema auricular inducido por TPA presentando actividad antiinflamatoria a las dosis de 500 y 1000 µg de muestra/oreja. Cabe resaltar que no existen precedentes de estudios similares en la especie estudiada, siendo este estudio el primer precedente.

En los estudios realizados por **Montanher, A., et al**¹⁰, se determinó el efecto antiinflamatorio de *Passiflora edulis* y los estudios realizados por **Sasikala, V.et al**⁸ y **Vargas AJ., et al**²⁷, determinan el efecto antiinflamatorio de *Passiflora foetida* L.

y *Passiflora alata* respectivamente en un modelo antiinflamatorio de edema plantar inducido por carragenina, y el estudio realizado por **Ballester, I., et al** ²⁸, en la que se confirma la relación entre flavonoides y efecto antiinflamatorio.

.

En la revisión de la literatura no se ha encontrado estudios de actividad antiinflamatoria para esta especie; sin embargo, se obtuvo información de estudios realizados en otras especies pertenecientes al género *Passiflora*.

El efecto antiinflamatorio se explicaría por la presencia de flavonoides en sinergia con otros grupos de constituyentes químicos de conocida actividad antiinflamatoria. El estudio realizado por **Enciso E., et al** ¹⁶, demostró la acción antiinflamatoria de los flavonoides extraídos de las hojas de *Jungia rugosa Less*, relacionada con la inhibición de diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico y radicales libres, y el estudio realizado por **Saudy P., et al** ¹⁸, demostraron la acción antiinflamatoria del extracto etanólico de *Eysenhardtia polystachya* (Ort.) Sarg, probablemente provocado por la inhibición selectiva de la COX-2.

Se evaluó el potencial de irritación dérmica, por el método Irritection Assay System y el potencial de irritación ocular, mediante el método del HET - CAM del extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”. No existen precedentes de estudios similares de la especie en estudio.

El perfil de irritación obtenido por diferentes técnicas, en las condiciones experimentales muestra que el extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” posee buen margen de seguridad preliminar, con tendencia a irritante probablemente atribuible a la naturaleza de la solución etanólica más que a la acción propia de los componentes que se extraen.

En el análisis de la toxicidad aguda dermal DL50 del extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, por el método de la OECD 434, presentó un DL50 Dermal > 20 g/Kg de peso o 3.8 mL/Kg de peso que de acuerdo a su clasificación final resulta Relativamente inocuo.

VI. CONCLUSIONES

El extracto etanólico del fruto al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” en el modelo experimental realizado presenta actividad antiinflamatoria al administrarse por vía tópica a la dosis de 500 y 1000 µg.

En el estudio de seguridad *in vitro* del extracto etanólico del fruto al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” demostró ser seguro como activo biológico en industria cosmética.

VII. RECOMENDACIONES

Promover la conservación y cultivo de la especie *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”.

Realizar la elucidación estructural por métodos espectrofotométricos de los principales constituyentes químicos presentes en el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”.

Realizar estudios de investigación de la especie *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, dado que se conoce tradicionalmente por sus actividades farmacológicas derivadas del uso en medicina tradicional.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rengifo E. Las ramas floridas del bosque. Instituto de investigaciones de la amazonia peruana. Iquitos, 2007. p. 127.
2. Muñoz A, Ramos D, Alvarado C, Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Rev Soc Quím Perú. 2007; 73 (3): 142-148.
3. Mostacero J, Mejía F. Taxonomía de las fanerogamas útiles del Perú. Perú. 2002 (1): 523-524.
4. Tapia M, Frías A. Guía de campos de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima 2007.
5. Perea M, Fischer G, Miranda D. Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales. Bogotá, Colombia. 2010.
6. Rojano B, Acosta K, Correa F. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012; 17(4): 408-419.
7. Becerra D. Efecto del origen del material vegetal y la edad sobre la capacidad morfogenética de dos especies de *Passiflora* (*Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey y *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. 2003.

8. Reyes M, Gómez-Sánchez I, Espinoza C, Bravo F, Ganoza L. Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Instituto Nacional de Salud. 8° Edición. Lima. 2009: 28.
9. Sasikala V, Saravanan S, Parimelazhagan T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2011; 4 (8): 600-603.
10. Saravanan S, Parimelazhagan T. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and antidiabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. Food Science and Human Wellness. 2014; 3: 56–64.
11. Montanher A, Zucolotto S, Schenkel E, Frode T. Evidence of antiinflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. Federal university of Santa Catarina. Florianopolis, SC, Brazil. 2013.
12. Rojas J. Estudio preclínico y clínico de la seguridad y actividad antihipertensiva de *Passiflora edulis* Sims (maracuyá). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2009.
13. Contreras J, Calderón L, Guerra E, García B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. Food Research International. 2011; 44: 2047–2053.
14. Carvajal L, Turbay S, Rojano B, Álvarez L, Restrepo S, Álvarez J, Bonilla K, Ochoa C, Sánchez N. Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16(4). p.354363.
15. Botero M, Ricaurte S, Monsalve C, Rojano B. Capacidad reductora de 15 frutas tropicales. Scientia et Technica. 2007; XIII (33): 295-296.

16. Enciso E, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An Fac med.* 2011; 72(4). p.231-237.
17. Bonkanka C. Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. Universidad La Laguna. Tenerife. España. 2007.
18. Saúdy P. Separación y evaluación del efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de *Eysenhardtia polystachya* (Ort.) Sarg. Instituto Politécnico Nacional. México DF, 2011.
19. Pereira A, Honório de Lima M, Cunha E, Khury E. Guía para la evaluación de la seguridad de productos cosméticos. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Brasilia. 2003.
20. Gorriti A, Jurado B, Quispe F. Manual de Laboratorio I y II. 1era ed. Lima. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional. 2004: 25.
21. Puebla P, Guerrero M, Correo S. Flavonoides del género crotón. *Rev. Col. Cienc, Quím. Farm.* 2004; 33 (1): 77-85.
22. López M. Flavonoides. *Fitoterapia. OFFARM*, 2002; 21 (4): 108-113.
23. Zaragozá F, Tofiño M, Oliveira L. Flavonoides y fitoterapia. *Revista de Fitoterapia* 2002; 2 (1): 21-32.
24. Robbins, Stanley, Ramzi Cotran. Patología estructural y funcional. México D.F. Ed. Interamericana. 1984.

25. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Actividad antiinflamatoria. CYTED; Bogotá, Colombia; 1995.
26. Lock O. Colorantes Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial 1997.
27. Vargas AJ, Geremias DS, Provensi G. Passiflora alata and Passiflora edulis spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. Fitoterapia. 2007. Feb; 78 (2): 112-119.
28. Ballester I, Camuesco D, Gálvez J. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. Universidad de Granada. Ars Pharm 2006; 47 (1): 5-21.

José R. Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tél: 6590223 Mov. 980170139
Email: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO, CBP N° 3796, CON APROVACIÓN DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA, INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES E IDENTIFICACIONES DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE-RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0218 - 2011-AG-DGFFS-DGEFFSEN.

Certifica:

Que, el Sr. **Erick Edwards Montes Manrique**, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, egresado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; con fines de investigación, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar "tumbo serrano", la misma que ha sido estudiada y determinada científicamente como *Passiflora mollissima* (Kunth)

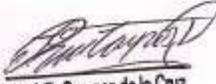
L.H. Bailey

REINO : Plantae
DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Dilleniidae
ORDEN : Violales
FAMILIA : Passifloraceae
GENERO : Passiflora
ESPECIE : *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey

Se expide la presente certificación para fines que se estime conveniente.

Lima, febrero del 2012




José R. Campos de la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva N° 156. Urbanización Santa Luzmila-Lima



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

CENTRO DE INFORMACIÓN, CONTROL TOXICOLÓGICO
Y APOYO A LA GESTIÓN AMBIENTAL - CICOTOX



REPORTE DE LA DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA DERMAL DL50

SOLICITANTE: ERICK MONTES MANRIQUE

DIRECCIÓN: Jr. Las Nepentas N° 320 - San Juan de Lurigancho

CODIGO: 54516

DATOS DE LA MUESTRA

Nombre Comercial: EXTRACTO ETANÓLICO AL 20% DE PASSIFLORA MOLLISIMA
Presentación: Frasco de vidrio transparente
Descripción del Producto: Líquido de color ambar
Cantidad recibida: 300 mL
Fecha de ingreso: 04/05/12
Fecha de resultado: 29/06/12
Análisis solicitado: Dosis Letal Media (DL50) - Dermal
Densidad de muestra: 0.83 g/mL
pH (20°C): 4.5
Método: OECD 434 (OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS)
Toxicidad Aguda Dermal - Procedimiento de Concentración fija.

DATOS DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Procedencia: Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Productos Biológicos (Bioterio)
Animal: Rata albina (*Rattus norvegicus*)
Cepa: Holtzman
Sexo: Hembra
Edad promedio: 3 meses
Rango de peso: 215.1 - 215.3 g
Peso promedio: 215.20 g
Situación microbiológica: Exento de organismos patógenos específicos
Número: 3 animales
Dieta: alimento balanceado y agua ad libitum
Condiciones de alojamiento: T° 22 ± 3° C. Humedad relativa: 30%. Iluminación artificial: 12 hrs de luz, 12 hrs de oscuridad

DOSIS ADMINISTRADAS

Muestra a administrar: EXTRACTO ETANÓLICO AL 20% DE PASSIFLORA MOLLISIMA No se realizó dilución
Dosis utilizada: > 20 g/Kg
Vía de administración: Dermal

RESULTADOS

Según el método OECD 434 la DL50 Dermal obtenida es > 20 g/Kg de EXTRACTO ETANÓLICO AL 20% DE PASSIFLORA MOLLISIMA/Kg de peso, que siendo expresado en mL, la DL50 Dermal es > 3.8 mL de EXTRACTO ETANÓLICO AL 20% DE PASSIFLORA MOLLISIMA/Kg de peso.

Se ha considerado para la DL50 Dermal, la densidad de EXTRACTO ETANÓLICO AL 20% DE PASSIFLORA MOLLISIMA, que es igual a 0.83 g/mL

CONCLUSIÓN

Toxicidad: DL50 Dermal Aguda es > 20 g de EXTRACTO ETANÓLICO AL 20% DE PASSIFLORA MOLLISIMA/Kg o > 3.8 mL de EXTRACTO ETANÓLICO AL 20% DE PASSIFLORA MOLLISIMA/Kg de peso.

Categoría: **Relativamente Inocuo**
Según: Organización Mundial de la Salud OMS/93



Q.F. Mariela del Rocío Navarro Nieto
C.Q.F.P. 10064

* Se adjunta datos del animal, entregado por el Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Productos Biológicos - Bioterio.