



**Universidad
Norbert Wiener**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL PERFIL DE SEGURIDAD DE
IRRITACIÓN DÉRMICA IN VITRO MEDIANTE EL MÉTODO
HET CAM. Y ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE
FORMULACIONES MAGISTRALES ELABORADAS CON
EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE
CHUPA SANGRE (*Oenothera rosea* Ait.)**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

Br. Manyari Pérez Lizeth Judith

Br. Suárez Becerra Ronal Elgar

Asesor:

Mg. Cárdenas Orihuela Robert Armando

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios por un nuevo día de vida y me bendiga con la alegría de tener a mis seres queridos conmigo. A mi familia, quienes me han inculcado los valores que me permitirán desarrollar hoy mi formación a base de esfuerzo y dedicación, por su amor incondicional y por alentarme a continuar a pesar de los obstáculos que se interponen en mi camino. A nuestro asesor Mg. Robert Cárdenas Orihuela, por su dedicado apoyo y asesoramiento, este presente trabajo no hubiera sido posible sin él.

Br. Manyari Pérez, Lizeth Judith

DEDICATORIA

Dios, déjame vida y deseo de obtener este profesional. A mi padre: Wilman y María por el apoyado afecto y sabiduría han hecho que posible la culminación de mis estudios superiores. A mis hermanos, debido a su alentador apoyo, asesoramiento y conocimiento en todos estos años de mi vida A nuestro asesor, Mg. Robert Cárdenas Orihuela, por el apoyo y asesoramiento desinteresado, sin él, la culminación del presente trabajo no habría sido posible.

Br. Suarez Becerra, Ronal Elgar.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer en primer lugar a nuestra Alma Mater la Universidad Norbert Wiener, quien nos alojó en sus magnas aulas para sembrar en nosotros el deseo de ser Químico Farmacéutico.

A mis grandes maestros por los que guardamos un gran respeto y admiración ya que con sus enseñanzas y desafíos hicieron que alcancemos nuestro potencial académico.

A Mg. Robert Cárdenas Orihuela, quien nos acompañó en esta difícil etapa con sus conocimientos y la inversión de su tiempo en el asesoramiento, nos permitió la culminación de nuestra tesis cuando pensábamos que no podríamos continuar, a usted muchas gracias.

Br. Manyari Pérez, Lizeth Judith

Br. Suarez Becerra, Ronal Elgar.

Índice general

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCION	1
- Situación Problemática	2
- Marco teórico referencial	3
- Estudios antecedentes	16
- Importancia y justificación de la investigación	23
- Objetivo de estudio	24
- Hipótesis de investigación	24
II. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1. Enfoque y diseño	25
2.2. Población, muestra y muestreo	25
2.3. Variables de estudio	27
2.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos	28
2.5. Proceso de recolección de los datos	38
2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos.	38
2.5.2. Aplicación de instrumentos de recolección de datos	38
2.6. Métodos de análisis estadísticos.	38
2.7. Aspectos bioéticos	39
III. RESULTADOS	40

IV. DISCUSIÓN	76
4.1. Discusiones	76
4.2. Conclusiones	79
4.3. Recomendaciones	80
CITAS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	87
ANEXO A: Operacionalización de variables	87
ANEXO B: Instrumentos de recolección de datos	89
ANEXO C: Consentimiento informado y/o asentimiento informado	90
ANEXO D: Acta o dictamen de informe de comité de ética	90
ANEXO E: Evidencias de trabajo de campo	92

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Solventes para la prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”	30
Tabla 2. Análisis de los perfiles fitoquímicos preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”	31
Tabla 3. Formula cuali-cuantitativa de las fórmulas magistrales: Gel al 0,5 y 1 %	33
Tabla 4. Clasificación de índice de irritabilidad para el perfil de seguridad por HET CAM.	37
Tabla 5. Resultados de las pruebas de solubilidad de los extractos hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	40
Tabla 6. Resultado del perfil cualitativo fitoquímico del extracto hidroalcohólico las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	42
Tabla 7. Recolección de datos de sus controles (patrones) del método HET- CAM	44
Tabla 8. Recolección de datos de los extractos de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre” a diferentes concentraciones del método HET- CAM.	45
Tabla 9. Recolección de datos de las fórmulas magistrales (gel) de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre” del método HET- CAM	46
Tabla 10. Tratamiento estadístico resumen del tiempo de hemorragia, lisis y coagulación de los patrones en segundos.	47
Tabla 11. Distribución de las muestras según su categoría de irritabilidad de los controles (patrones).	48

Tabla 12.	Tratamiento estadístico resumen del tiempo de la hemorragia, lisis y de coagulación en segundos de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre” por concentración.	50
Tabla 13.	Distribución de las muestras de extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre” según categoría de irritabilidad por concentración.	52
Tabla 14.	Estadísticas del tiempo de Hemorragia, lisis y Coagulación del gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre” en segundos.	53
Tabla 15.	Distribución de los geles con el extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre” según categoría de irritabilidad por concentración.	55
Tabla 16.	Prueba de homogeneidad de varianzas del índice de irritabilidad entre grupos (suero fisiológico y extractos al 0,5; 1; 2 y 5%).	57
Tabla 17.	Prueba de Kruskal Wallis: Comparación de índice de irritabilidad del suero fisiológico y extractos al 0,5; 1; 2 y 5%.	58
Tabla 18.	Games-Howell variable dependiente: Índice de irritación del suero fisiológico y extractos al 0,5; 1; 2 y 5 %.	60
Tabla 19.	Games-Howell variable dependiente: Índice de irritabilidad de extractos al 0,5 y 1 % y los geles al 0,5 y 1 %.	61
Tabla 20.	Games-Howell variable dependiente: Índice de irritabilidad de extractos al 0,5 y 1 % y los geles al 0,5 y 1 %.	62
Tabla 21.	Recolección de datos de la actividad cicatrizante (mm)	64
Tabla 22.	Evolución de la cicatrización, cierre de la herida (mm)	65
Tabla 23.	Prueba de Homogeneidad de varianzas del diámetro de cierre de la herida entre grupos.	72
Tabla 24.	Prueba de Homogeneidad de varianzas del diámetro de cierre de la herida entre grupos.	73
Tabla 25.	Comparaciones múltiples Tukey de la actividad cicatrizante.	74

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Especie vegetal de estudio <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	4
Figura 2. Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	29
Figura 3. Elaboración de las fórmulas magistrales con el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	34
Figura 4. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	41
Figura 5. Análisis del perfil cualitativo y fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait “Chupa sangre”.	43
Figura 6. Valores promedio del índice de irritabilidad por tratamiento patrón.	48
Figura 7. Valores promedio del índice de irritabilidad del extracto hidroalcohólico hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre” al 0,5, 1, 2 y 5 %.	51
Figura 8. Valores promedio del índice de irritabilidad de los geles al 0,5 y 1 % realizados en base del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	54
Figura 9. Distribución de los tiempos de hemorragia, lisis y coagulación de cada tratamiento.	56
Figura 10. Distribución del índice de irritabilidad por tratamientos con el extracto hidroalcohólico con diferentes concentraciones.	59

Figura 11.	Índice de irritabilidad del extracto Hidroalcohólico de las hojas del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”	63
Figura 12.	Distribución de los valores de cierre de herida al inicio del experimento (día 0)	66
Figura 13.	Distribución de los valores de cierre de herida a 7 días de iniciado el experimento.	67
Figura 14.	Distribución de los valores de cierre de herida a 14 días de iniciado el experimento.	68
Figura 15.	Distribución de los valores de cierre de herida a 21 días de iniciado el experimento.	69
Figura 16.	Distribución de los valores de cierre de herida a 28 días de iniciado el experimento.	70
Figura 17.	Evolución del diámetro del cierre de las heridas incisas en las cepas biológicas	71
Figura 18.	Actividad cicatrizante del Gel elaborado con el extracto hidroalcohólico hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	75
Figura 19.	Estudio taxonómico realizados en el museo de la historia natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.	92
Figura 20.	Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. “Chupa sangre”.	83
Figura 21.	Elaboración de los geles al 0, 5 % y al 1 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait.” Chupa sangre”.	94
Figura 22.	Procedimiento para el perfil de seguridad por HET CAM.	95
Figura 23.	Procedimiento para el desarrollo de la actividad cicatrizante por el método de heridas incisas.	96

Índice de anexos

	Pág.
Anexo A. Operacionalización de variables	84
Anexo B. Instrumentos de recolección de datos	86
Anexo C. Consentimiento informado y/o asentimiento informado	87
Anexo D Acta o dictamen de informe de comité de ética	88
Anexo E Evidencias de trabajo de campo	88

RESUMEN

Este estudio de investigación se ha sido realizado con el **objetivo** de evaluar el perfil de seguridad de irritación dérmica in vitro mediante el método científico de Het - Cam. y actividad cicatrizante de las formulaciones magistrales elaboradas a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chupa sangre (*Oenothera rosea* Ait.).

Método: El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, prospectivo fue desarrollado en los laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la universidad Norbert Wiener. La muestra vegetal de estudio fue recolectada en la región de Pasco provincia de Pasco en el poblado de Huariaca y ubicada a una Altitud de 2 941 msnm. Luego de la recolección de la planta se realizó el secado a temperatura ambiente por un tiempo de 5 días, luego fue triturarlo usando un molidor de acero. Para evaluar la actividad irritante se empleó el método de HET-CAM y para determinar la actividad cicatrizante se utilizó el método de heridas incisas. Al extracto se le realizó la prueba de solubilidad y análisis fotoquímico.

Resultado: Presento solubilidad en agua y etanol, se evidencio la presencia de metabolitos secundarios como: Fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides y antraquinonas. Se prepararon geles a la concentración de 0.5 % y 1 % demostrando que son irritantes leves (I.I. 2,66 y 4.38) para la actividad cicatrizante fue necesario formar 4 grupos de trabajo constituido por 8 ratas cada grupo, el G1 se le administro agua destilada (control negativo), el G2 y G3 fueron las muestras a tratar y al G4 se le administro Cicatricure (control positivo), **Conclusión:** demostraron que para la actividad cicatrizante las concentraciones G3 (0,5%) y G4 (1%) presentaron buen performance cicatrizante, sin embargo, el control positivo alcanzo una mejor cicatrización. Se concluye que extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa Sangre" ha demostrado buen perfil de seguridad irritante y actividad cicatrizante.

Palabras clave: perfil de seguridad, irritación dérmica, cicatrizante.

ABSTRACT

This research study has been carried out with the aim of evaluating the in vitro dermal irritation safety profile using the Het-Cam scientific method. And healing activity of master formulations made from the hydroalcoholic extract of the leaves of Chupa Sangre (*Oenothera rosea* Ait.). Method: The present research work is experimental, prospective, and was developed in the laboratories of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the Wiener University. The sample was obtained in the region of Pasco province of Pasco in the town of Huariaca and located at an altitude of 2 941 meters above sea level. After harvesting the plant, it will be dried at room temperature for 5 days, then it was crushed using a steel grinder. To evaluate the irritating activity, the HET-CAM method was used and to determine the healing activity, the incised wounds method was determined. The extract was tested for solubility and photochemical analysis. Result: Present solubility in water and ethanol, it was evident the presence of secondary metabolites such as: Phenols, flavonoids, tannins, alkaloids and anthraquinones. Gels were prepared at a concentration of 0.5 % and 1 %, demonstrating that they are mild irritants (II, 2.66 and 4.38). For the healing activity it was necessary to form 4 working groups consisting of 8 rats each group, the G1 was administered distilled water (negative control), G2 and G3 were the samples to be treated and G4 was administered Cicatricure (positive control), Conclusion: they showed that for the healing activity the concentrations G3 (0.5%) and G4 (1%) presented Good healing performance, however, the positive control achieved better healing. It is concluded that hydroalcoholic extract of the leaves of *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" has a good profile of irritating safety and healing activity.

Keywords: safety profile, dermal irritation, healing.

I. INTRODUCCIÓN

Un proceso de irritación es una alteración fisiológica, la cual puede estar acompañada de edema (inflamación) o eritema (enrojecimiento) de la piel provocada por algún agente biológico, químico o físico, medicamento o cosmético. Algo más grave y complicado es la irritación ocular la cual altera la fisiología de las membranas oculares, pudiendo ocasionar opacidad corneal, quemosis, secreción o dolor. Por último, la sensibilización es el proceso por el que las células se hacen sensibles a la acción de un agente.

En Europa existe una carrera comercial para obtener productos cosméticos, continuamente se está probando ingredientes en fórmula para obtener productos naturales novedosos y no son irritantes para la administración en el ser humano. respecto a esta tendencia, los laboratorios de la industria cosmética se encuentran en las búsquedas de los ingredientes de origen vegetal para ser agregados en sus formulaciones. Sin embargo, en nuestro país son muy escasos los estudios de investigación enfocados en productos cosméticos a base de extractos vegetales, siguiendo las normas de seguridad y eficacia. (1)

Actualmente, los laboratorios de investigación en el mundo se han visto en la necesidad de implementar el ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, HET-CAM) para determinar la evaluación de irritación ocular ocasionada por productos cosméticos; por la rapidez, sencillas, sensibilidad, fácil de ejecutar y su bajo costo. (2)

Perú, es un país con pocos métodos alternativos para evaluar toxicidad; sin embargo, las regulaciones globales requieren que la investigación científica incluya toxicidad y funcionalidad de los productos cosméticos, evalúe utilizando métodos alternativos al uso de animales de laboratorio.

El método HET CAM para la evaluación de la irritación, aún no ha sido implementado en los laboratorios peruanos de investigación, por lo cual

consideramos que el presente trabajo es pionero en nuestro medio, y la implementación de la técnica para productos cosméticos.

- **Situación problemática**

La medicina tradicional en el Perú, se basa en la utilización de plantas medicinales con la finalidad de preparar remedios caseros para calmar las molestias, con la finalidad y el hecho de utilizar una crema, o aplicarse un gel, si no se elige las sustancias adecuadas y estos deben tener una concentración establecida, para que estos no se conviertan en un atentado contra la salud, ocasionando un sin fin de trastornos potenciales para la vida.

En el Perú las industrias cosméticas y la medicina tradicional se basan en la utilización de aceites, extractos, tinturas, para la elaboración de sus productos y estos son aplicados a las personas que las requieren en algunas ocasiones causándoles irritación, en algunas ocasiones empeora sus padecimientos y enfermedades que en algunas veces se vuelven más graves por la misma aplicación de concentraciones desconocidas. Debido a estos problemas la presente investigación se abordó con la finalidad de dar a conocer concentraciones óptimas e ideales logrando la mejoría de las dolencias. Y a la vez identificación y proporcionar los beneficios para la salud.

Para realizar una evaluación de las nuevas formas farmacéuticas e indicar la farmacotoxicidad de las muestras vegetales, en la mayoría de los ensayos se vienen realizando en animales que durante los estudios sufren daños irreversibles, con el fin de garantizar la inocuidad del fármaco o de un producto cosmético (4). Draize describió en 1994 una prueba que evalúa los eventos tóxicos a este nivel e identifica la irritación causada por productos químicos, fármacos y cosméticos. Desde su introducción, la prueba ha sido criticada. Sobre todo, por razones éticas y científicas, esto ha impulsado la búsqueda de nuevos métodos alternativos direccionados a eliminar defectos, basadas principalmente en la reducción del número de animales utilizados, mejorando la metodología y sustituyéndola por métodos de ensayo in vitro. (1)

Las técnicas de pruebas de laboratorio tienen beneficios potenciales en las pruebas in vivo debido a su velocidad, la facilidad de aplicación y la cantidad que terminan fácilmente, ensayos in vitro tienen ventajas potenciales frente a los ensayos in vivo debido a su rapidez, también ayudan a reducir el número de animales experimentales con alivio del dolor y daños causados. La prueba de irritación de los ojos (HET-CAM) se utiliza para evaluar las irritaciones potenciales que pueden ser causados por productos cosméticos, utilizando huevos de gallina sobre la capa corioalantoidea, donde las arterias, venas y capilares. (2) El nivel de irritación de la piel se evalúa a través del sufrimiento de la inflamación. El momento de la aparición y el tamaño del daño es la aparición del material estimulante en la evaluación (hemorragia, lisis vascular y coagulación). (3) por diferentes factores o agentes agresores.

En Perú la mayoría de las lesiones pueden ser leves, graves y severas; a consecuencia de ello muchos personas se encuentran en peligro dependiendo de las patologías como el caso de los pacientes con diabetes mellitus.

Esta problemática nos permite plantearnos la siguiente pregunta de investigación.

Planteamiento del problema

¿Cuál será el perfil de seguridad de irritación dérmica in vitro mediante el método de HET CAM y la actividad cicatrizante de formulaciones magistrales (geles) elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait “Chupa sangre”?

- Marco teórico referencial

Aspectos botánicos y farmacológicos de *Oenothera rosea* Ait.

Descripción botánica de la especie *Oenothera rosea* Ait.

Oenothera rosea Ait., es una planta proveniente de América, se desarrolla en todo el continente. Es una planta que puede encontrarse todo el año, su tamaño es de 50 cm alto, su tallo presenta vellosidades, el tallo es recto y de

ella se desprende hojas anchas y alternas. Presenta cáliz y sépalos de color verde, presente corola la cual está formada por 4 pétalos. Sus frutos presentan una forma clavicular casi elíptica, presenta semillas con abundantes vellosidades cubiertas de una envoltura. Presenta flores rosadas y fucsias, una característica de esta planta es que reacciona con los rayos solares, abriendo sus flores a los fotones de luz desprendido por el sol. Esta planta en estado silvestre se puede encontrar en la costa y en los andes, llegando a encontrarse a una altura de cuatro mil quinientos metros sobre el nivel del mar.



Figura 1. Especie vegetal de estudio *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”

Clasificación botánica de la especie *Oenothera rosea* Ait.

La muestra vegetal (planta completa) fue llevada al Museo de la Historia Natural de la UNMSM y fue determinado por el Mag. Asunción A. Cano Echevarría.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Rosidae

Orden: Myrtales

Familia: Onagraceae

Género: *Oenothera rosea* Ait.

Especie: *Oenothera rosea* Ait.

Nombre vulgar: Chupa Sangre

Composición química

Presenta una composición en la cual pueden encontrarse unas grandes cantidades de principios activos en los que se pueden destacar la presencia de: flavonoides, compuestos alcaloides, derivados de las quinonas, compuestos fenólicos, saponinas y taninos. También algunas partes útiles como las hojas presentan en su composición ácidos esenciales como el cafeico, cumarico y elagico. Esta planta se caracteriza por presentar en su composición vitaminas hidrosolubles como la vitamina C un potente antioxidante natural por lo que la planta tiene mucha importancia botánica y farmacológica. La raíz también fue estudiada por marcha fitoquímica encontrándose la presencia de compuestos como ácido gálico, se estudiaron también las semillas encontrándose ácidos de tipo cis linoleico, linolenico, palmítico, esteárico, glutámico y aspártico. Las hojas contienen alcoholes triterpenicos. (5)

A. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos que presentan un amplio grupo de vegetales y que están distribuidos en muchos órganos de las plantas y que presentan actividades farmacológicas potentes. Los pigmentos pueden presentar a dosis controladas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, venotónicos, presenta además propiedades antihemorrágicas, vasculo protectoras, antiespasmódica y diuréticos. En los últimos años la investigación de la Chupa Sangre, han demostrado propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antivirales (6). Esta planta ha recibidos estudios con la finalidad de demostrar su propiedad queladora ante diferentes iones como el hierro, tiene la propiedad de interactuar con las prostaglandinas y leucotrienos. Se cree que los flavonoides presentes en la Chupa Sangre, pueden modular los procesos inflamatorios al interactuar sobre las ciclooxigenasas y diversas citoquinas productoras de inflamación. Hoy en día se siguen desarrollando estudios con los flavonoides a partir de productos naturales y sintéticos debido a la capacidad que poseen los anillos aromáticos. (7)

B. Taninos

Son polifenoles ampliamente distribuidos en diferentes especies vegetales de naturaleza hidrosoluble y que, en contacto con las proteínas, tienden a precipitarlas formando cuero y curtiendo la piel. Se conocen alrededor de 500 compuestos derivados de los taninos y estos están presentes en especies vegetales como: Myrtaceae, Leguminosae, Onagraceae, Polygonaceae, Rhizophoraceae y Fagaceae.(8) Estudios farmacológicos han demostrado que posee propiedades cicatrizantes y vasoconstrictoras, sobre la superficie de la piel y a concentraciones bajas se puede demostrar actividad antibacteriana, en algunas afecciones pueden actuar como bactericida o bacteriostáticas, la acción también se ha demostrado sobre diferentes hongos por lo que tienen propiedades anti fúngicas. Se ha evidenciado la auto oxidación de la vitamina C o ácido ascórbico, incrementa el tono muscular y actúa sobre el colágeno estabilizando. (9)

Propiedades medicinales destacadas

Las hojas tienen muchas aplicaciones cuando se maceran se pueden utilizar como cataplasmas, la administración de esa forma se usa en luxaciones, fracturas, trastornos reumáticos y lumbalgicos. Se pueden preparar pociones con las hojas y alcohol para administrar en bebidas en el tratamiento de tuberculosis, se ha descrito propiedades antibacterianas de las hojas y flores para el tratamiento de la gonorrea, los emplastos se emplean para la prevención de la agregación plaquetaria. La raíz se usa en forma de maceraciones para el tratamiento de neumonía. (5)

HET CAM

- ✓ **Definición de embrión.** Es un organismo multicelular “En los organismos con reproducción sexual, la fusión de espermatozoides y del huevo en un proceso llamado fertilización, determina la formación de un cigoto, que contiene una combinación de ADN de ambos padres.”
“Justo después de su formación, el cigoto comienza un proceso de división, que produce un aumento en el número de células, llamadas blastómeros. Después de que comienza el proceso de diferenciación

celular que determinan la formación de los diferentes órganos de acuerdo con un patrón establecido para dar lugar a un cuerpo final.”

“Frente a este proceso de diferenciación celular pueden distinguir tres etapas: la etapa de blastocito, la gastrulación y organogénesis.”(10)

✓ **Incubación**

Son las etapas de la incubación de los huevos fértiles: denominado al acto por el cual los animales que ponen huevos (especialmente aves) incuban los huevos colocándose sobre ellos para proporcionar calor suficiente el que va dar lugar al desarrollo del embrión de los mismos. (10)

✓ **Irritación aguda**

Llamado también estado inflamatorio o reacción dolorosa en el organismo provocados principalmente agentes químicos, físicos o del medio ambiente tales como (el calor o la luz solar y/o ultravioleta).

Puedes sufrir de irritaciones en cualquier parte del cuerpo y en diferentes magnitudes en órganos tales como (ojos, nariz) (10)

✓ **In vitro**

Denominado a las técnicas controladas de experimentación en un tubo de ensayo en un laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, estas técnicas se desarrollan fuera de organismos vivos. (10)

✓ **Membrana corioalantoidea**

La membrana corioalantoidea es una capa también conocida como el exterior del embrión derivada del sistema digestivo primitivo del endodermo embrionario, como se encuentra en las aves y otras razas ovíparas y no ovíparas, así como en algunos mamíferos. El feto se encuentra entre el amnios y el corion. “A medida que avanza el crecimiento del feto, su tamaño disminuye gradualmente, convirtiéndose

en un saco alargado que surge del cuerpo del cigoto, que se convierte en parte del parte del cordón umbilical. (10)

✓ **Prueba de Draize**

La prueba de Draize es una prueba de toxicidad basada en la gravedad creada en 1944 por un equipo de toxicólogos John H. Draize y Jacob M. Spines, de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). “Existen dos variantes de la prueba: La prueba de irritación cutánea aguda (o prueba de Draize para piel) y la prueba de irritación ocular aguda (o prueba de Draize para mucosas).”

“El procedimiento, que se usaba inicialmente para probar cosméticos, consiste en la aplicación de 0,5 mL o 0,5 g de una sustancia de prueba en el ojo o en la piel de un animal consciente e inmovilizado, dejarla durante un periodo de tiempo, y después enjuagarla y tomar nota de sus efectos.”

Los animales de experimentación se observaron cuidadosamente durante 14 días en busca de signos de eritemas y edemas al realizar las pruebas cutáneas, luego se evaluaron el enrojecimiento, la inflamación, la hemorragia exudativa y ceguera en la prueba de irritación ocular, generalmente esta evaluaciones se realizan en conejos albinos entre otros mamíferos y ovíparos, aunque en algunas ocasiones también son incluidos los perros, los animales son sacrificados tras las pruebas experimentales realizadas cuando los daños son irreversibles en la piel u ojos, cuando estos animales no sufren daños severos pueden ser sujetos a someterlos a otros pruebas, para llevarlos a ser participes de estos nuevos ensayos tienen que pasar por una limpieza y un descanso previo para no generar alteraciones de los ensayos, la administración de alimentos y medicamentos incita a las pruebas, indicando que "a la fecha, ninguna prueba o batería de pruebas ha sido aceptada por la comunidad científica como un reemplazo la prueba de Draize", de acuerdo al caso controversial, el uso o practica de la prueba se ha dejado de lado en los últimos años en Estado Unidos de América y en Europa en ocasiones se ha venido mejorando con la aplicación de anestesia en dosis mínima de la sustancia aprueba. (11)”

Herida

Se conocen a las heridas como lesiones del tejido producto de una lesión por agente físico o químicos, las heridas son lesiones que el hombre puede regenerar de manera natural, sin embargo, esta propiedad ya se ha perdido y la capacidad regenerante se ha perdido (11).

El cuerpo humano solo tiene la capacidad de regenerar lentamente algunas partes de su cuerpo sobre todo cuando las lesiones son pequeñas, sin embargo, cuando las lesiones son mayores, el proceso de regeneración se hace nulo. La cicatrización cutánea es un proceso reparativo complejo que conduce a la regeneración del epitelio y el reemplazo de la dermis por un tejido fibroso constituido por colágeno con características diferentes al normal. Las nuevas fibras son más cortas y desorganizadas, por lo que la cicatriz nunca presenta la fuerza tensora de la piel ilesa (12)

Clasificación de las heridas

A. Clasificación general:

- ✓ Heridas abiertas: Se trata de una herida cuya capacidad de cicatrización se ve afectada haciendo que se exponga el contenido interno y pueda infectarse con facilidad. Se trata de heridas que requieren tratamiento inmediato.
- ✓ Heridas cerradas: Aparentemente son las benignas, si el sistema inmunológico regenera con facilidad las heridas no se infecta, sin embargo, cuando las heridas se infectan y cierran el proceso de daño se exagera poniendo en riesgo la vida de los pacientes.
- ✓ Heridas simples: Son aquellas lesiones que no provocan un daño grande a la piel y esta puede regenerarse sin dejar evidencia de las lesiones.
- ✓ Heridas complicadas: Se refieren a heridas profundas cuyo daño interno es muy importante, provoca ruptura de tendones, vasos sanguíneos llegando a perforar vísceras. (13)

B. Clasificación según el elemento que las produce son:

1. Heridas cortantes o incisivas: Los objetos afilados como latas, vidrios, cuchillos, que pueden seccionar músculos, tendones y nervios. Los bordes de la herida son limpios y rectos, la cantidad de la sangre depende del lugar y el número de los vasos sanguíneos afectados.
2. Heridas punzantes: se produce por cosas agudas como clavos, agujas, anzuelos o mordeduras de serpientes. La herida es dolor, el sangrado puede ser muy raramente y el agujero de entrada es poco notorio; es considerado como peligroso porque puede ser profundo la más peligrosa porque puede ser profunda, haber perforado vísceras y provocar hemorragias internas. Son heridas de fácil infección, ya que la limpieza de la herida se dificulta o no es soportada como debe ser. Las complicaciones conjuntas son tétanos.
3. Heridas corto punzante: Son causadas por objeto con filo y puntiagudo como cuchillos, lanzas, tijeras, estas heridas son internas llegando a perforar huesos.
4. Heridas laceradas: provocan el desgarro de la piel o músculos, se produce por objetos planos con filo acerrado.
5. Raspaduras, excoriaciones o abrasiones: También llamadas raspones o escoriaciones, se trata de heridas que en la piel producen pérdida de tejido, son lesiones extensas a lo largo de la piel. (14)

Cicatrización

Definición

Cuando la dermis y la epidermis se dañan, el cuerpo humano tiene la propiedad de regenerarlo, a este proceso se llama curación, la cicatrización en un proceso natural con el cuerpo para hacerle frente a las lesiones o ruptura de tejidos, en la cicatrización se producen una serie de procesos químicos y bioquímicos con la finalidad de reparar el tejido. Estos procesos naturales se anteponen uno al otro formando las diferentes fases de regeneración o cicatrización: inflamatoria, proliferativa, y de remodelación. Para entender mejor se define estos términos. (15)

Proceso de cicatrización

Fase I: Respuesta inflamatoria

Cuando ocurre una lesión, se produce un proceso inflamatorio, se produce la migración leucocitaria y este proceso desencadena en enrojecimiento fiebre y dolor de la zona afectada, en esta etapa se produce un cierre de la parte afectada, un coágulo que mantiene unido las áreas lesionadas. Los coágulos están formados por una malla de fibrina, con la adición de plaquetas, entre otras células plasmáticas, así como glóbulos rojos, proteínas, componentes sanguíneas, y anticuerpos (4)

Los componentes del plasma, como los leucocitos y monocitos en descomposición, se transforman en macrófagos para participar del proceso de eliminación de desechos celulares, microorganismos fagocitados, neutrófilos extraños y extracelulares y los tejidos se mueven desde el borde de la piel a través de la incisión para cerrar la superficie. De la herida se desarrolla en fibroblastos. Al mismo tiempo, los fibroblastos ubicados en los tejidos conectivos profundos comienzan a moldear el tejido no epitelial. Promueve la formación de una costra sobre la superficie dañada, para sellar la salida de fluidos que provocan invasión bacteriana. (14)

Fase II: Migración y proliferación

Es la segunda etapa del proceso de cicatrización que se estima una duración de 3 a 4 semanas, el coágulo se transforma en una capa comúnmente denominada costra, los fibroblastos se mueven debajo para debajo para cubrir la herida. Las enzimas de la sangre y las células de los tejidos circundantes, los fibroblastos forman colágeno y matriz (fibrina, fibronectina). Estas sustancias hacen que los fibroblastos se adhieran a la matriz. Los fibroblastos contienen miofibroblastos con propiedades de músculo liso que promueven la contracción de la herida. La acumulación de colágeno comienza alrededor del quinto día y aumenta rápidamente la resistencia a la tracción de la herida. Los aminoácidos de plasma son responsables de

fortalecer las actividades móviles básicas para sintetizar los tejidos fibrosos durante este periodo de curación.

Cuenta con la fase de gran popularidad de las células epiteliales en la concha, la acumulación de fibras de colágeno en un modelo aleatorio y mantiene el desarrollo de los vasos sanguíneos. Presenta eclosión, tanque de colágeno, formación de tejido de granulación y eliminar la herida. (14)

En el proceso de angiogénesis, nuevos vasos sanguíneos evolucionan a partir de células endoteliales. Durante la granulación y fibroplasia, los fibroblastos crecen y forman una nueva matriz extracelular mediante la secreción de colágeno y fibronectina. (14)

Fase III: Maduración o remodelación

Durante esta fase, la piel comienza a demostrar cambios y reparación, esto se debe a la acción del colágeno los vasos sanguíneos se van recuperando poco a poco gracias a los fibroblastos. Inicialmente la recuperación es lenta, pero al pasar los días ya se ve una recuperación mayor de la herida,

En el proceso de la cicatrización normal ocurre por contracción de la herida en periodos largos de semanas y en algunos casos hasta meses. Cuando aumenta la densidad del colágeno disminuye la formación de vasos sanguíneos nuevos y de tejido cicatricial toma una coloración débil. (14)

Por lo tanto, los fibroblastos y productos, como las proteínas de colágeno y los minerales, así como los vasos sanguíneos, son los principales factores responsables de las heridas adultas.

Las cicatrices a medida que van madurando, se torna a una coloración rojiza debido a que disminuye la densidad de capilares. Así mismo muchos de los vasos sanguíneos que se forman durante la fase proliferativa se desintegran como consecuencia de un fenómeno denominado apoptosis. Cuando ocurre muerte celular programada, es probable que este regulada por una variedad de moléculas de fondo, como las trombospondias 1 y 2, y varios factores antigénicos, como la angosturina, endostatina y angiopoyetina 2. Asimismo, la cantidad de fibroblastos se reduce y caracterizada así por la ausencia de

apéndices dérmicos. Se plantea la hipótesis de que la ausencia de pelo en las cicatrices se debe a que el callo no se da el microambiente o ubicación adecuada que requiere la célula madre responsable de la formación de apéndices para sobrevivir. (15)

Tipos de cicatrización

A. Primera intención o cierre primario.

“Es aquella que se da en las heridas muy superficiales, que no traspasan la dermis, se produce un cierre primario espontáneo por la toma de contacto de sus bordes, mientras que en las que existe una clara separación de éstos solamente la acción quirúrgica (sutura de la herida) puede conseguir este cierre primario.” Para que puede producirse el cierre primario, es necesario que se cumplan las condiciones siguientes:

- Que la herida no se infecte
- Que se produzca un proceso de hemostasia perfecto
- Que los bordes sean uniformes
- Que la herida sea cerrada de manera uniforme por los pliegues lacerados (16)

B. Cierre secundario (segunda intención)

Es un tipo de cierre no uniforme, se lleva a cabo con bordes separados, el daño fue tal que la herida dejó un desplazamiento del tejido que no le permitió un cierre primario, en este proceso se produce un llenado de la parte descubierta. A este proceso de relleno se le denomina proceso de granulación. Con este proceso se completa la parte faltante de tejido y se favorece la cicatrización (16)

C. Cierre terciario (tercera intención)

Se produce cuando se induce de manera manual o quirúrgica al cierre de la herida, las suturas son el ejemplo clásico de cierre terciario. La finalidad de este proceso es acelerar la cicatrización y no exponer la parte interna al medio ambiente. (16)

Factores que retardan la cicatrización

1) Medicamentos

- Corticoides: Son fármacos que van a provocar la disminución del proceso inflamatorio además provoca que el organismo genere fibroblastos los cuales irán a tapizar las heridas produciendo una neovascularización y reepitelización.
- Citotóxicos: Tienen la función principal de reducir la proliferación celular.
- Anticoagulantes: Son fármacos que retardan la formación de coagulo en la herida, factor importante para el inicio de la cicatrización.

2) Raza

Las cicatrices en pacientes de raza negra son más propensas a la hipertrofia del tejido cicatrizado que en la raza blanca; entre la raza blanca y los individuos rubios tienen probabilidades de cura que los morenos. Se observa mayor tendencia a la hiperpigmentación tras la escisión de la piel, episódica o quirúrgica.

3) Edad

En los ancianos provoca una disminución de la función pulmonar y cardiovascular, lo que provoca una disminución de la circulación y el suministro de oxígeno, y una disminución del crecimiento de los fibroblastos y la producción de colágeno. La piel se debilita debido a la pérdida de elasticidad y firmeza de los tejidos.

4) Nutrición

Para este fin, se deben de encontrar aminoácidos, algunos cofactores vitamínicos y proteína. La deficiencia de proteínas puede reducir los vasos sanguíneos, síntesis de colágeno, multiplicación celular y reparación de las heridas. De manera similar, diferentes minerales son importantes para la cicatrización; así como el zinc es un cofactor en la síntesis de proteínas y en la proliferación celular. Vitaminas: Una buena alimentación asume una mezcla de vitaminas que promueven el proceso de cicatrización:

- La vitamina A, para la síntesis de colágeno y para la epitelización.

- La vitamina B, entre ellas la tiamina, riboflavina y piridoxamina, son cofactores para el enlace cruzado de colágeno.
- La vitamina C, también es de importancia crítica para el enlace de las fibras colágenas.
- La vitamina K, es necesaria para la síntesis de factores de coagulación II, VII, IX, y X. Su deficiencia se acompaña de hemorragia y de mala cicatrización.

5) Tensión del oxígeno

Es un proceso que tiene la finalidad de acelerar el proceso de cicatrización, mediante el oxígeno se favorece a prevenir los procesos de muerte celular (isquemia) se favorece la formación y síntesis de sustancias como el colágeno. El oxígeno retrasa la acción de los microorganismos en la herida por lo tanto el tiempo de curación disminuye. Mediante esta técnica se puede evitar el dolor, la presencia de calor y sensación de inflamación, así como la migración leucocitaria.

(17)

- Antecedentes

Antecedentes internacionales

Díaz L. (2019) en su tesis titulada, evaluación de la permeación y la irritación ocular y dérmica de una mezcla de ramnolípidos a través de metodologías in vitro. **Objetivo:** contribuir al perfil de seguridad de una mezcla de ramnolípidos obtenida comercialmente con perspectivas de uso en la industria cosmética. **Material y método** metodologías in vitro, fue evaluado su perfil de permeación empleando celdas de Franz con montajes de piel de cerdo que fue sometida a evaluación histológica para valorar la irritación

dérmica junto con cultivos celulares; adicionalmente la irritación ocular fue estimada a través de HET-CAM y RBC. Se logró determinar la afinidad de los ramnolípidos por el estrato córneo en donde quedó principalmente retenido (94.2%). Se diseñó una escala para valorar los cambios morfológicos celulares, útiles en la determinación del potencial de irritación dérmica, demostrando que los ramnolípidos no inducen mayores alteraciones histológicas, **Conclusiones:** Los estudios de citotoxicidad cutánea mostraron mayor variabilidad con los biosurfactante que con otros tensoactivos, lo que también se muestra en la evaluación de la irritación oftalmológica, mostrando apoyo para el uso de esta sustancia, por otro lado, las pruebas como HET CAM y RBC, así como al ser práctico y accesible, sirve como una buena fuente de información de seguridad a nivel oftálmico, gracias a su asociación con SGA(RBC).(18)

Guaita M. (2018) en su tesis titulada, determinación de las actividades fotoprotectora, genotóxica y de irritación ocular in vitro del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides*, **Objetivo:** Determinar la actividad fotoprotectora in vitro del extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* a 20, 200 y 2000 ppm así como la capacidad del extracto para causar irritación ocular y genotoxicidad a diferentes concentraciones siendo la máxima 500 ppm, **Material y método,** a través del tamizaje fitoquímico se evidencia la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides . El extracto seco de *Lippia scorodonioides* se obtiene por un proceso de concentración y posterior secado del extracto hidroalcohólico. El contenido de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante, (utilizando DPPH), (FPS) se miden por métodos espectrofotométricos. La capacidad de irritación de los ojos se determinó por el método de HET CAM y CAM-TBS, **Conclusión:** El extracto hidroalcohólico de *Lippia scorodonioides* no presentó irritación en los ojos, ni capacidad de inducir genotoxicidad. (19)

Fernández A. Gonzales M. et al (2016) En la revista titulada evaluación de la toxicidad ocular in vitro de los colirios fortificados antibióticos elaborados en los servicios de farmacia hospitalaria. **Objetivo:** evaluación de la toxicidad ocular in vitro de los colirios fortificados antibióticos

elaborados en los Servicios de Farmacia Hospitalaria. **Material y método** se realizó un estudio experimental in vitro para evaluar la toxicidad de los colirios de gentamicina, Amikacina, cefazolina, ceftazidima, vancomicina, colistimetato de sodio e imipenem-cilastatina en el que se ha evaluado su citotoxicidad y la irritación tisular aguda. Los ensayos celulares se realizaron sobre queratocitos estromales humanos, mediante la utilización de un sistema biosensor de impedancia celular [(xCELLigence Real-Time System Cell Analyzer (RTCA))] y los ensayos de irritación ocular mediante el ensayo Hen's Egg Test. Todos los colirios, excepto vancomicina e imipenem, han mostrado un efecto citotóxico de concentración y tiempo dependiente, siendo las concentraciones más altas y los tiempos más prolongados los que provocan un descenso más pronunciado en la población de queratocitos estromales. La vancomicina muestra un importante efecto citotóxico inicial que devuelve en el tiempo y el imipenem se muestra en forma de un compuesto no tóxico para las células estromales. Los vehículos que tienen un efecto de irritación más grande para la superficie del ojo son la gentamicina y la vancomicina. Los colirios anti infecciosos elaborados en los Servicios de Farmacia Hospitalaria estudiados se muestran como compuestos potencialmente Citotóxicos para la superficie del ojo, que depende del enfoque del usuario. (20)

Antecedentes nacionales

Celestino F. Llacsá L. (2018). En la tesis titulada evaluación de irritabilidad ocular in vitro mediante el método de HET- CAM en cremas para contornos de ojos con registro sanitario y sin registro sanitario comercializados en el distrito de la victoria – la parada – Lima con el **Objetivo** de comparar el nivel de irritación de las cremas de contorno de ojos con registro sanitario y sin registro sanitario de una variedad de marcas, la cantidad de cremas analizadas fueron de 5 unidades por cada grupo de estudio, las mencionadas muestras fueron conseguidas en el centro comercial la parada

del distrito de la victoria en la provincia de lima, debido a la demanda de distribuidores de productos de belleza y de aseo personal, la **Metodología** a sido basada en el protocolo 108 de las técnicas in vitro en toxicología (INVITTOX) que consiste en el estudio de reacción de variantes de ensayos sobre la membrana corioalantoidea en los huevos de gallina para determinación de la irritación ocular Los **Resultados**: La irritación potencial de diez formulaciones de cremas para contornos de ojos comercializadas con registro sanitario y sin registro sanitario son altamente irritantes para el contorno de ojos por lo que representa el 80 % de riesgo para las personas que utilizan, con respecto a las cremas que cuentan con registro sanitario presenta baja irritabilidad con una representación del 10% de riesgo. **Conclusiones**. En la determinación cualitativa y cuantitativa se concluye que las cremas con registro sanitario son conforme para la aplicación indicada, mientras que las cremas sin registro sanitario son un atentado por su alto riesgo para la salud de las usuarias. (21)

Quiroz R; Moreno G. (2018) en su tesis titulada evaluación de irritabilidad mediante el método de HET- CAM, de gel elaborado con el extracto hidroalcohólico de las hojas Phymatosorus grossus (calaguala) proponiéndose como **Objetivo**. Se ha evaluado el índice de irritabilidad del gel elaborado con extracto hidroalcohólico elaborado con hojas de Phymatosorus grossus(calaguala) la **Metodología** utilizada fue analítico, transversal aplicando el diseño de tipo experimental, los indicadores de referencia para la determinación de índice de irritabilidad fueron, hemorragia lisis coagulación para determinar la irritabilidad se utilizaron 55 huevos de gallina fértiles los cuales fueron distribuidos en 11 grupos de estudio, los cuales se trataron como control positivo, blanco, con solventes y otros con los extractos hidroalcohólicos a concentraciones de prueba a 5%, 2%, 1% y 0.5% también se llegó a formar un grupo para la evaluación de gel al 1% y el otro con gel al 0.5% elaborados con extracto hidroalcohólico de calaguala en cada uno de los grupo se ha utilizado 5 huevos fértiles de gallina, se controlaron los tiempos de hemorragia, lisis y coagulación mediante el método HET – CAM se determinó que los extractos son muy solubles en agua y alcohol, solubles en metanol y poca solubilidad en otros solventes

como acetona, se determinaron metabolitos secundarios, Los **Resultados:** con el método HET – CAM, para el extracto hidroalcohólico de calaguala se demostró que a concentraciones de 1% y 2% han sido clasificados como irritante moderado alcanzando un valor de 5.25 y 8.78 sin embargo a la concentración de 0.5% alcanzo un valor de 2.54 clasificado como irritante leve, para el caso de los geles preparados a concentración de 1% presento un índice de irritación moderado de 5.96 a comparación con el gel de 0.5% ha demostrado un índice de 0.96 clasificado como no irritante, **Conclusiones** los geles a base de extracto de las hojas de calaguala a concentración de 0.5% ha demostrado un índice de irritabilidad leve el cual ha sido clasificado como el más indicado en función a su concentración para la preparación de formas farmacéuticas o galénicas o hasta inclusive preparado magistral. (22)

Rivera M. (2017) En su trabajo de investigación con título actividad irritante ocular in vitro por el método HET- CAM, del extracto etanolico de la raíz y hojas de Rumex crispus L. Cuturumasa se propusieron el **Objetivo**, determinar la actividad irritante del extracto etanolico de la raíz, tallos y hojas de Rumex crispus, con la aplicación del Método de HET – CAM, se logró aislar metabolitos metabolitos primarios y metabolitos secundarios cabe mencionar que se llegaron a preparar 4 disoluciones al 5%, 2%, 1% y 0.5% para las muestras de estudio de raíz, tallo y hojas, se llegaron a empelar grupos control con hidróxido 0.1 N Lauril sulfato de sodio 1% y suero fisiológico, además de ello también se ha evaluado la actividad del solvente en la membrana corioalantoidea de huevos fértiles de gallina doméstica, previo al proceso de incubación artificial de 9 días, en este prueba ha permitido corroborar que la dilución de 0.5% del extracto etanolico de las hojas de Rumex crispus L. Cuturumasa, los **Resultados** se ha podido demostrar que no produce roctura de la membrana corioalantoidea, el índice de irritación menor a 0.9 es para la raíz y tallo si producen irritabilidad mayor de 1.0 en todas las concentraciones , **Conclusiones.** se puede concluir en el presente trabajo de investigación que los índices de irritación obtenidos con el 0.5% de extracto hidroalcohólico de las hojas de Rumex, se considera

como no irritante y contribuye en la seguridad y la eficacia para los usuarios (23)

Mayta M. (2018) en su tesis titulada estandarización y validación del método HET-CAM para determinar irritabilidad oftálmica en champus para bebés. Proponiendo el **Objetivo**: estandarización y validación de la prueba de irritabilidad oftálmica in vitro, utilizando el **Método** de irritación de la membrana corioalantoidea por medio de tinción con azul de tripán (CAM-TBS) Para evaluar champus destinados a bebés, comercializados en Perú. Material y método: se evaluaron tres marcas (a,b,c) de champus para bebés, de formulaciones similares, la estandarización y la validación del método se realizó en el laboratorio de Toxicología y Química Legal; en la validación del método HET-CAM cualitativo y cuantitativo (CAM-TBS) se utilizó la marca de champú y se evaluaron para proceso de validación tener en cuentas los siguientes parámetros Linealidad, precisión y exactitud; y para la aplicación del método HET-CAM cualitativo y cuantitativo se evaluaron los índices de irritabilidad (I.I) de las tres marcas de champus para bebés. Los **Resultados** los parámetros han sido sometieron a pruebas estadísticas demostrando el método in vitro HET-CAM cualitativo y cuantitativo (CAM TBS) propuesto para medir la irritabilidad oftálmica es lineal (correlación positiva y significativa $R=0.998$) Preciso (precisión intermedia: CV día uno =1.185, CV día dos 1,887, prueba de Levene $p=0,054 \geq 0,05$ y t de Student $p=0,926 \geq 0,05$ para dos analistas; Repetibilidad: $CV=2.7\%$ y $p=0,988 \geq 0,05$ que indica que no existe diferencia significativa) y exacto (correlación de Pearson $R= 0,99$; no existe diferencia significativa entre concentración y porcentaje de recuperación $p=0,06 \geq 0,05$) por otro lado los índices de irritabilidad (I.I) Obtenidos clasifican a los champus como el champú A resulta ser no irritante ($0,064081 \pm 0,010015 < 0,100$ nmoles/mg). El champú B y el champú resultan ser irritantes severos ($0,202561 \pm 0,004578 > 0,150$ nmoles/mg y $0,184801 \pm 0,005363 > 150$ nmoles/mg respectivamente). **Conclusión** se estandarizo la prueba de irritabilidad oftálmica in vitro utilizando el método HET – CAM, Cualitativo y cuantitativo determinándose las condiciones óptimas para su aplicación. (24)

Ramos C, Villegas B (2015) En la presente tesis de investigación titulada determinación de la actividad cicatrizante de las sumidades floridas de *Oenothera rosea* en extracto y gel aplicado en heridas producidas experimentalmente en animales de laboratorio pertenecientes a la especie de *rattus novergicus* teniendo como **Objetivo** principal de la investigación determinar la actividad cicatrizante de las sumidades floridas de *Oenothera rosea* en extracto y gel aplicado en heridas producidas experimentalmente en animales de laboratorio, **Metodología** para el desarrollo de la presente investigación se ha obtenido tres extractos mediante el método de soxhlet, utilizando como solventes en combinación de éter de petróleo, cloroformo y de alcohol etílico, para poder analizar cual de los mencionados extractos tiene mejor eficacia bajo una estricta evaluación, los mencionados extractos fueron combinados con una base de carbopol al 20% para la obtención del gel en los **Resultados** en la evaluación estadística se ha demostrado al gel con extracto de alcohol etílico presenta la mayor eficacia cicatrizante frente a su control, en la demostración de la actividad cicatrizante se ha trabajado con tres grupos, conformados por 5 animales de laboratorio a los que se les realizó los cortes, a dos grupos para el tratamiento y un grupo como control la dosis para evaluación son dos aplicaciones por día, por el lapso de 10 días consecutivos, para demostrar la eficacia se usa los estadísticos de (prueba t y análisis de varianza) concluido esta etapa podemos mencionar que los extracto con 130.77% y el gel con las sumidades floridas de *Oenothera rosea* (Yawar concha) con 111.54% tienen eficacia cicatrizante significativa frente a su grupo control después de la comparación entre grupos (test de turkey) se llega a la siguiente **Conclusión**, cabe resaltar que los extractos de *Oenothera rosea* (Yawar concha) que se aplicó sobre heridas en ratas practicadas en el laboratorio presenta mayor efectividad cicatrizante frente a la sustancia control que debería contar con mayor eficacia por ser una forma farmacéutica comercial autorizada con registra sanitario tiene una gran desventaja (25)

Celestino K, López J. (2018) En esta investigación se ha evaluado por el efecto del gel cicatrizante a base del extracto etanólico de las hojas de ortiga (*urticaria Urens L*) y extracto etanólico del mucilago de sábila (*Aloe Vera (L)*)

Burn) en ratas albinas, **Objetivo** se comprobó el efecto cicatrizante de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de la ortiga (*urticaria Urens L*) y del mucilago de sábila (*Aloe Vera (L) Burn*) en ratas albinas, cuando los animales son anestesiados se realiza las escisiones en la parte posterior de cada forma descrita el Método descrito por Nayak y Col 2005 (publicación validada en PubMed), luego se marcó el área de la escisión de aproximadamente 1x1 se procedió a realizar los cortes con un bisturí de acero inoxidable, luego de la generación de los cortes. Con la aplicación diaria de las muestras en su enfoque y a diferentes concentraciones y volúmenes, la medición de las áreas de cierre de las heridas, se realizan a los 0, 7, 14, 21, 28 días, en los Resultados se llegó a identificar metabolitos secundarios, alcaloides, glucósidos, flavonoides, antraquinona, se cuantifico la presencia de flavonoides totales en ambas muestras se encontró 2.95mg/mL para ortiga, y 0.07mg/mL para la sábila. **Conclusiones** durante el proceso experimental se demostró que el extracto etanólico de ortiga de ortiga (*urticaria Urens L*) y extracto etanólico del mucilago de sábila (*Aloe Vera (L) Burn*) presenta actividad de curación en ratas albinas demostrando que la variabilidad de concentración nos da la dosis adecuada para el tratamiento, las dosis y concentraciones del gel a base de extracto etanólico de la ortiga (*urticaria Urens L*) y extracto etanólico de sábila (*Aloe Vera (L) Burn*) tiene actividad cicatrizante, la concentración del gel C ortiga al 10% y sábila al 20% alcanzaron el nivel más alto de cicatrización llegando al 95% del cierre de la herida, prueba que existe un significado comparativo con el control positivo (cicatrin®) por vía tópica.(26)

- **Importancia y justificación**

Es importante para los investigadores, ya que, propone nuevos métodos de análisis, así como procedimientos innovadores a los ya existentes, con la finalidad de fomentar el reemplazo de animales de experimentación por métodos alternos cuyos resultados sean muy similares a los anteriores. Las legislaciones modernas justifican el empleo de métodos alternativos y en la universidad aplicamos el método de ensayo de HET- CAM, para

procedimientos dérmicos y oculares solicitados en la industria cosmética y poco a poco en la industria farmacéutica en las formas farmacéuticas oculares por instilación.

El presente estudio de investigación científica es justificado en los siguientes campos de aplicación.

- Salud: todas las especies vegetales con propiedades medicinales, son empleados con fines de tratamiento paliativos, desde hace muchos años, esto hizo que se vaya profundizando en el estudio y conocimiento de la biodiversidad de plantas medicinales, que poseen propiedades curativas y esto motiva a investigar para utilizar nuevos métodos de extracción y formulación de nuevos productos.
- La organización mundial de la salud incentiva el uso de la medicina tradicional, entre otras alternativas cuando estas han demostrado su aplicación segura y efectiva en pacientes con un riesgo mínimo.
- Socio económico: Actualmente se ha incrementado el uso de plantas medicinales, teniendo en cuenta que la población que más usan es aquellas de estrato económico bajo. A partir de ello se ha podido elaborar diferentes formas farmacéuticas (gel, ungüento, pomada, etc.) a los cuales tienen acceso, sin tener en cuenta lo perjudicial que podría ser al no saber a qué concentración es recomendable usar en el caso de que se aplique cerca del ojo. A raíz de ello se eligió el estudio de la especie vegetal "*Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre".

- **Objetivo de estudio**

Objetivo principal

- Demostrar el perfil de seguridad de irritación dérmica in vitro y la actividad cicatrizante de las formulaciones magistrales elaborada con el extracto hidroalcohólico de las hojas de "*Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" mediante el método HET CAM.

Objetivo específico

1. Verificar el perfil cualitativo fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de "*Oenothera rosea*" Ait. "Chupa sangre"
2. Elaborar una fórmula magistral gel a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de "*Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" con actividad cicatrizante.
3. Determinar el índice de irritabilidad de la fórmula magistral (gel) con el extracto hidroalcohólico de las hojas de "*Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" por el método HET- CAM.
4. Comprobar el efecto cicatrizante de la fórmula magistral gel de extracto hidroalcohólico de las hojas de "*Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre".

- Hipótesis de investigación

La formulación magistral elaborada con el extracto hidroalcohólico de las hojas de "*Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" presenta un perfil de seguridad (método de HET CAM) y actividad cicatrizante (método de heridas incisas).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Enfoque y diseño de la investigación

El presente trabajo es de tipo Cualitativo-cuantitativo.

- Aplicada: Experimental (Evaluación farmacológica)

- Analítico: Evaluación de la composición química que presentó el extracto y se pudo deducir como influye este en el proceso de cicatrización, así como en la actividad irritante.
- Descriptivo: los hallazgos que se encontraron en la investigación fueron documentados
- Experimental: Mediante la introducción de huevos de gallina fertilizados y animales de experimentación para determinar la actividad irritante y cicatrizante, y utilizando diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico.
- Transversal: El proceso analítico y experimental se desarrolló bajo un cronograma estricto desde abril 2018 a mayo del 2019.

Según su diseño es de tipo experimental; es decir, se empleó un grupo experimental y grupo de control. Por otro lado, la investigación se desarrolló en un determinado año, por lo que el estudio fue longitudinal.

2.2. Población, muestra y muestreo (Criterios de inclusión y exclusión)

2.2.1. Población y muestra

- Se utilizaron 1 500 g de hojas frescas y limpias de "*Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" del distrito de la provincia de Huariaca, departamento de Cerro de Pasco a una a una Altitud de 2 941 msnm. Con la cual se elaboró el extracto hidroalcohólico y posterior las fórmulas magistrales: geles al 0,5 % y 1 %.
- 30 huevos de gallinas fértiles.
- 32 ratones albinos machos *Rattus norvegicus*, de 02 meses de edad aproximadamente con un peso estimado de aproximadamente de 220 g (cepa Holtzman), procedentes del bioterio del instituto nacional de salud (INS) y los mismos que han sido alojados en Bioterio de la Universidad Norbert Wiener-Lima.

2.2.2. Tamaño de muestra

Actividad cicatrizante:

Como el tamaño de la población es infinito, y el interés está en estimar el diámetro promedio de cierre de herida, la fórmula correspondiente a este objetivo está dada por:

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

Dónde:

Z α = 1,96 percentil 95 de la distribución Normal usada para que la estimación tenga un nivel de seguridad o confianza del 95%.

Z β =1,29 percentil 90 de la distribución Normal usada para que la potencia de la prueba sea del 90%

d= 0,1 cm es la precisión o diferencia mínima entre los diámetros promedios que queremos detectar como significativa (1 mm).

S= 0.063 es la desviación estándar del diámetro de la herida (*).

(*) (Obtenida de Celestino K y López P. 2018). (26)

Reemplazando tenemos:

$$n = \frac{2(1.96 + 1.29)^2 0,063^2}{0.1^2} = 8$$

Luego se necesitan 8 ratas en cada grupo para detectar una diferencia de al menos 0,1 centímetros con una significancia del 5%.

2.2.3. Muestreo

Aleatorio simple.

2.2.4. Criterios de inclusión y exclusión

2.2.4.1. Criterio de consideración en la inclusión

- a. Se consideraron todos los huevos de gallina fértiles.

- b. Se consideraron todos aquellos que alcanzaron el tiempo de incubación establecida.
- c. Se consideraron aquellos huevos que llegaron a formar la membrana corioalantoidea correctamente.
- d. Se consideran todas las ratas que tengan la edad de 02 meses y un peso aproximado de 220 g.

2.2.4.2. Criterio de consideración en la exclusión

- a. Se rechazaron aquellos huevos demasiado pequeños.
- b. Se rechazaron aquellos que no lograron formar la membrana corioalantoidea.
- c. Se rechazaron aquellos huevos con cámara de aire muy reducida.
- d. Se rechazarán aquellas ratas que no cumplan con especificado.

2.3. Variables de estudio

2.3.1. Variables independientes

Extracto hidroalcohólico de las hojas *Oenothera rosea* Ait “Chupa sangre”.

2.3.2. Variable dependiente

1. Perfil de seguridad de irritación dérmica in vitro.
2. Actividad cicatrizante.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.4.1. Método del perfil cualitativo fitoquímico

- **Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de Chupa sangre "*Oenothera rosea* Ait."**

Se seleccionaron las hojas frescas y limpias se dejaron secar en un recipiente limpio; se pesaron 1 500 g de hojas de *Oenothera rosea* Ait "Chupa sangre" para luego ser triturado y macerado durante 8 días en alcohol de 70 ° a temperatura ambiente con agitación periódica. Posteriormente se filtró y se dejó secar a 40 °C por 8 días en una estufa de aire circulante hasta obtener el extracto seco y ser almacenado en un frasco ámbar. (Ver figura 2).

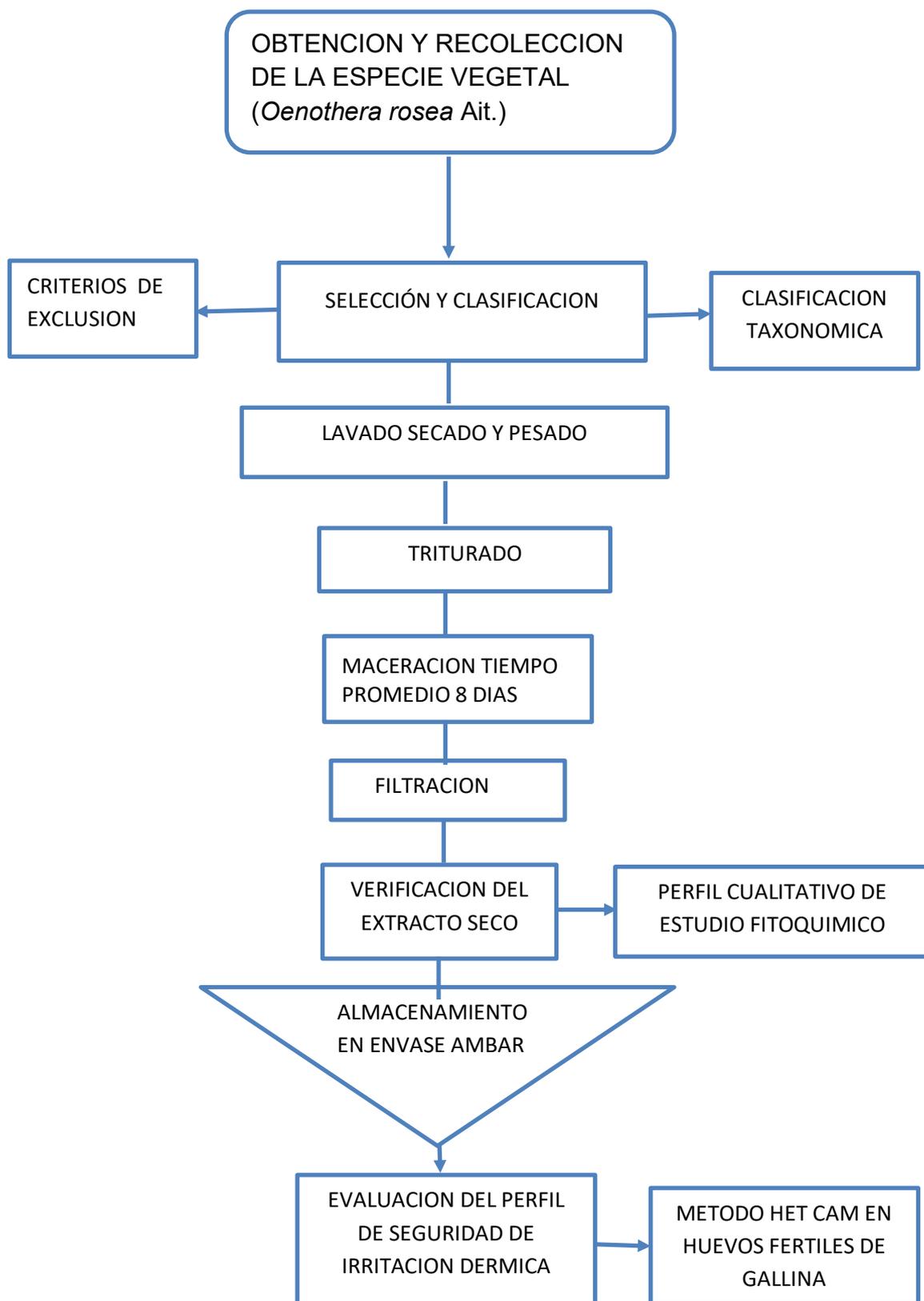


Figura 2. Obtención del extracto hidroalcoholico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”

- **Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”**

Después de obtener el extracto de las hojas de *Oenothera rosea* Ait “Chupa sangre”, se procedió a realizar los ensayos de la solubilidad utilizando 10 g del extracto y 07 tubos de ensayos para incorporar solventes de diferentes polaridades. (27) (Ver tabla 1)

Tabla 1. Solventes para la prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”.

SOLVENTES	FÓRMULA
Etanol	C ₂ H ₆ O
Cloroformo	CHCl ₃
Éter de petróleo	C ₅ H ₁₂
Butanol	C ₄ H ₁₀ O
Metanol	CH ₃ OH
Agua destilada	H ₂ O
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂

- **Análisis del perfil cualitativo fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”**

Fue desarrollado con el propósito y el objetivo de determinar la presencia de determinados metabolitos primarios y secundarios; para ello se utilizó 1 g de la muestra del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” diluido en 20 mL de metanol (prueba de solubilidad). Se incorporó 1 mL del extracto diluido en cada tubo de ensayo y luego los reactivos correspondientes.

Se desarrollaron los siguientes ensayos. (Ver tabla 01)

Tabla 2. Análisis del perfil fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre"

N°	METABOLITO	REACCIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
1	Flavonoides	Shinoda V gotas + 1.0 mL de extracto hidroalcohólico + limadura de magnesio y X gotas de HCL concentración.	Coloración anaranjada	Positivo
2	Cumarinas	Hidróxido de sodio V gotas + 1.0 ml de extracto hidroalcohólico + V gotas de hidróxido de amonio	Fluorescencia verde amarillento	Negativo
3	Quinonas	Hidróxido de sodio al 5 % 0.4 mL +1.0 mL de extracto hidroalcohólico + III gotas de alcohol etílico	Cambio de coloración	Negativo
4	Alcaloides	Dragendorff V gotas + 1.0 mL de extracto hidroalcohólico acidificada	Precipitado naranja a rojo	Positivo
5	Alcaloides	Mayer V gotas + 1 mL de extracto hidroalcohólico acidificada	Precipitado crema	Positivo
6	Carbohidratos	Molish V gotas + 1.0 mL de extracto hidroalcohólico + III gotas de H ₂ SO ₄ concentración.	Anillo violeta	Positivo
7	Aminoácidos libres y grupos amino	Ninhidrina V gotas +1.0 mL de extracto hidroalcohólico + calentamiento	Coloración violácea	Negativo

8	Triterpenoides y esteroides	Lieberman – Burchard V gotas + 1.0 mL de extracto hidroalcohólico + X gotas de cloroformo + V gotas de anhídrido acético + III gotas de H ₂ SO ₄	Esteroides: Verde –azul Triterpenoides: Rojo –naranja	Negativo
9	Saponinas	Agua destilada 1 mL+ 1.0 ml de extracto hidroalcohólico + agitación	Generación de espuma	Negativo
10	Glucósidos	Baljet V gotas + 1.0 ml de extracto hidroalcohólico +5 g de ácido pícrico + 5 g NaOH 5 %	Coloración anaranjada	Negativo
11	Compuestos fenólicos	Cloruro férrico V gotas + 1.0 ml de extracto hidroalcohólico + agitación	Coloración verde azulado	Positivo
12	Taninos	Gelatina y cloruro de sodio 1 mL + 1.0 mL de extracto hidroalcohólico	Precipitado blanco	Positivo
13	Naftaquinonas , antraquinonas y antronas	Bornträger V gotas + 1.0 mL de extracto hidroalcohólico III gotas de NaOH 5 % acidificar con HCl y dejar en reposo, separar la fase bencenica con adicionar gotas hidróxido de amonio	Coloración roja	Positivo

2.4.2. Elaboración de la fórmula magistral: Gel

Para la elaboración del gel se utilizó Carbapol 940 (polímero altamente reactante), trietanolamina (polímero gelificante), agua destilada de pH 6.9 (vehículo).

Una vez obtenido el gel, se agregó los extractos a la concentración de 0,5 % y 1 % respectivamente. Los productos fueron guardados en envases de polietileno de alta densidad protegidos de la luz y el calor hasta la administración en animales.

Para la elaboración de los geles al 0,5 % y 1 % se realizó con las siguientes formulas:

Tabla 3. Formula cuali-cuantitativa de las fórmulas magistrales:
Gel 0,5 % y 1 %

Nº	Descripción de la materia prima	Unidad de medida	Cantidad	
			Gel al 0,5 %	Gel al 1 %
1	Carbopol 940	g	1,5	1,5
2	Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait.	g	0,5	1,0
3	Trietanolamina	mL	0,5	0,5
4	Agua destilada c.s.p.	mL	100	100

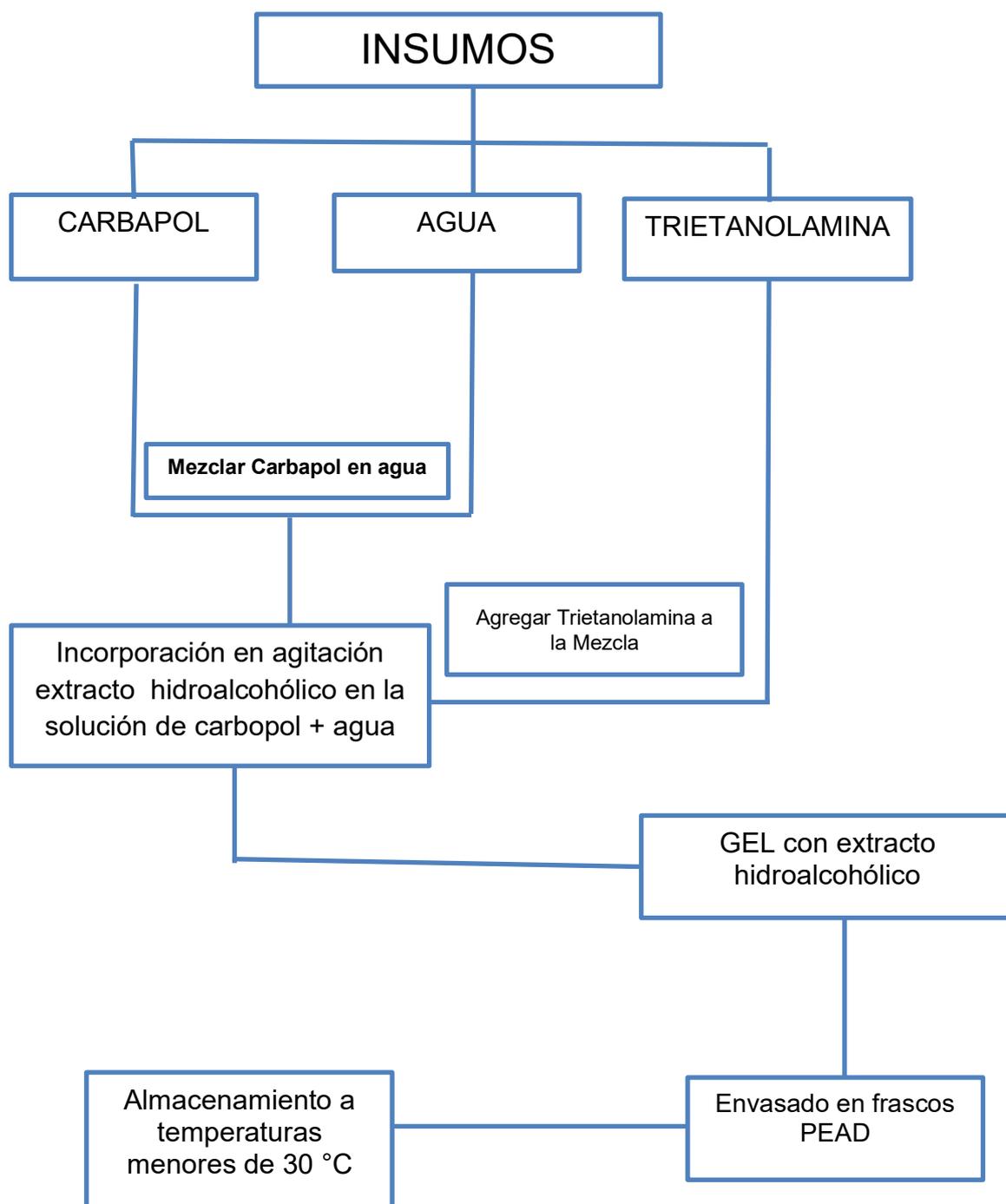


Figura 3. Elaboración de las fórmulas magistrales con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”.

2.4.3. Técnica para el perfil de seguridad: HET CAM

Para la presente investigación se usaron huevos embrionados de gallinas de la raza White Leghorn, con un peso entre 50 y 60 g. Los reactivos empleados fueron NaCl al 0,9% para el lavado de la membrana, así como NaOH a 0,1 N y SDS al 1% tomados para controles positivos.

Hemos empleado material quirúrgico oftálmico, tales como tijeras y pinzas, lámpara fluorescente para observación de las reacciones, lámpara, guantes para el examen de los embriones, cronómetro para tomar el tiempo, tubos de ensayos para las pruebas de solubilidad, beaker para los precipitados y humectación del carbopol, frascos de tapas esmeriladas, pipetas de cristal, pipetas Pasteur, bandejas esmaltadas y frascos lavadores.

Los huevos sujetos de estudio han sido colocados en la incubadora, manteniéndolos a una temperatura de $37,5 \pm 0,5$ °C y una humedad relativa de $62,5 \pm 7,5\%$, con la respectiva cámara de aire hacia arriba y sin rotar hasta que alcanzaron los 10 días de incubación, los embriones fueron revisados bajo una luz de la lámpara para poder determinar su viabilidad con el desarrollo del estudio y en caso de los que no cumplen desechar estos por diferentes factores que hayan interferido como rasgaduras o aumento de la porosidad en el mismo momento se marcara con pulmón indeleble la cámara de aire una vez marcada para exponer la membrana blanca la cual a sido previamente humedecida con suero fisiológico a 0.9% después de haber realizado este procedimiento se regresó a la incubadora para evitar su enfriamiento por un periodo de tiempo estimado promedio entre 20 y 30 minutos antes de haber realizados los procedimientos subsiguientes. (28)

Posterior a esto se retiró dicha membrana cuidadosamente con la ayuda del material quirúrgico oftálmico requerido para el mencionado proceso, con la finalidad de evitar dañar la membrana corioalantoidea que ha quedado expuesta y evaluar su integridad y utilidad para ser estudiada y evaluada para los fines previstos, se incorporó las soluciones denominadas estándar de irritación , se observó detenidamente las reacciones de hemorragia, lisis y coagulación por un tiempo determinado de 5 minutos, se registró el tiempo en segundos en que da lugar la aparición de cada una de las variables para poder calcular el índice de irritación ocular. (I.I.). (Ver flujograma N° 4)

El índice de irritabilidad se realizo a través de la siguiente formula.

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

Dónde:

Seg H: Tiempo de aparición de hemorragia

Seg L: Tiempo de aparición de lisis

Seg C: Tiempo de aparición de coagulación

Se llego a determinar el índice de irritación, para 2 huevos con el sodio dodecil sulfato al 1% y 2 huevos con NaOH 0,1 N denominados patrones de comparación.

Las dos sustancias evaluadas como patrones de referencia que se constituyen bajo la denominación de controles positivos que recogieron en el protocolo y que fueron utilizados para un mejor abordaje de la técnica. Para las evaluaciones del efecto irritante de la muestra problema de investigación que se preparó en diferentes proporciones que cuyas diluciones están al 5, 2, 1 y 0.5% de concentración, para determinar con un mayor grado de certeza se realizaron las pruebas por triplicado (tres huevos)

sobre la MCA aplicados directamente que estén cubriendo como mínimo de la mitad de su superficie durante 5 min; transcurrido este tiempo establecido, se procedió con el correcto lavado con NaCl al 0,9% para eliminar la misma de la superficie de la membrana. (28)

Se a evaluado la severidad de las tres reacciones posibles (hemorragia, lisis y coagulación) a los 5 minutos de aplicación de las sustancias en evaluación toxicológica, de las cuales se determinara su clasificación de acuerdo a la siguiente escala de estudio.

Tabla 4. Clasificación de índice de irritabilidad para el perfil de seguridad por HET CAM.

Rango HET CAM	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

Clasificación para determinar que la muestra en estudio es irritante según su rango.

Si se observó alguna reacción de escala 3 en cualesquiera de los tres tipos de reacciones, entonces se repite el ensayo utilizando otros tres huevos embrionados, pero con un tiempo de exposición del producto de 1 min y se reevalúa la reacción obtenida, utilizando la misma escala. La evaluación final de la magnitud de irritabilidad se asigna atendiendo a la puntuación más alta obtenida en tres réplicas. (28)

2.4.4. Análisis farmacológico: Actividad cicatrizante

Para la determinación de la actividad cicatrizante se llegaron a utilizar ratones albinos machos, *rattusno vergicus*, de una edad

aproximada de dos meses con un peso estimado de 220 gramos cada uno los mismos que han sido provenientes del bioterio del instituto nacional de salud y han sido alojados en el bioterio de la universidad privada Norbert Wiener.

Para la utilización de los animales de experimentación primero se ha tenido en cuenta el siguiente procedimiento que a continuación se describe.

Se procedió a la depilación del lomo de los ratones, con la ayuda de una crema depiladora concluido esta primera parte del procedimiento se colocan en jaulas especiales, para realizar las heridas incisas se procedió a anestésiar utilizando ketamina (40 mg/kg y xilocaína (15mg/kg) bajo las condiciones de asepsia, se procede a realizar las incisiones de 1 cm x 1cm con la ayuda de una hoja de bisturí de acero inoxidable estéril en cada animal con una profundidad de 0.2 cm, concluido esta primera fase de la generación de heridas incisas, se procede a aplicar el tratamiento a todos los grupos de estudio.

Las mediciones de las áreas de cierre se realizo con una frecuencia señala cada 7 días, partiendo del día 0, 7, 14,21 y 28 días de iniciado el tratamiento, todos los puntos detallados en el procedimiento se ha realizado en el Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, bajo condiciones controladas de temperatura de 22 ± 2 ° C y humedad relativa menor de 70 % otorgando condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad además garantizando su alimentación (agua y alimento)

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnica: Observación

- Prueba de solubilidad
- Prueba de análisis cualitativo fitoquímico
- Prueba de HET CAM
- Análisis farmacológico: Actividad cicatrización

2.5. Proceso de recolección de datos

2.5.1. Autorización y coordinaciones previas a la recolección

No aplica.

2.5.2. Aplicación de instrumentos en la recolección de datos

- Realizar la observación
- Revisar todas las medidas bajo las mismas condiciones de confort.
- En el caso de duda sobre la medida de una unidad de análisis, descartar su evaluación.
- Registrar los datos sin ofuscaciones, cambios o manchas. Tachar los espacios en blanco que no necesitas completar con una sola línea.

2.6. Método de análisis estadístico

Todos los datos obtenidos de la investigación fueron registrados en una hoja electrónica de Microsoft Excel versión 2013, luego se exporto los datos a un archivo SPSS versión 25.0 para el análisis estadístico correspondiente.

La ilustración de los resultados se realizó en Microsoft Word y Excel Versión 2013 mediante gráficos de barras, líneas y diagrama de caja.

2.7. Aspectos bioéticos

Esta investigación cumplió con todos los principios éticos en el desarrollo de la investigación experimental y en la población seleccionada, así como también en la adopción de un método alternativo como es el método de HET CAM con la finalidad de disminuir el uso de animales de experimentación en el tiempo.

III. RESULTADOS

3.1. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre".

Tabla 5. Resultados de la prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre".

SOLVENTES	RESULTADOS
Etanol	+
Cloroformo	-
Éter de petróleo	+
Butanol	-
Metanol	+
Agua destilada	+
Ciclohexano	-

Leyenda: Soluble (+) Insoluble (-)

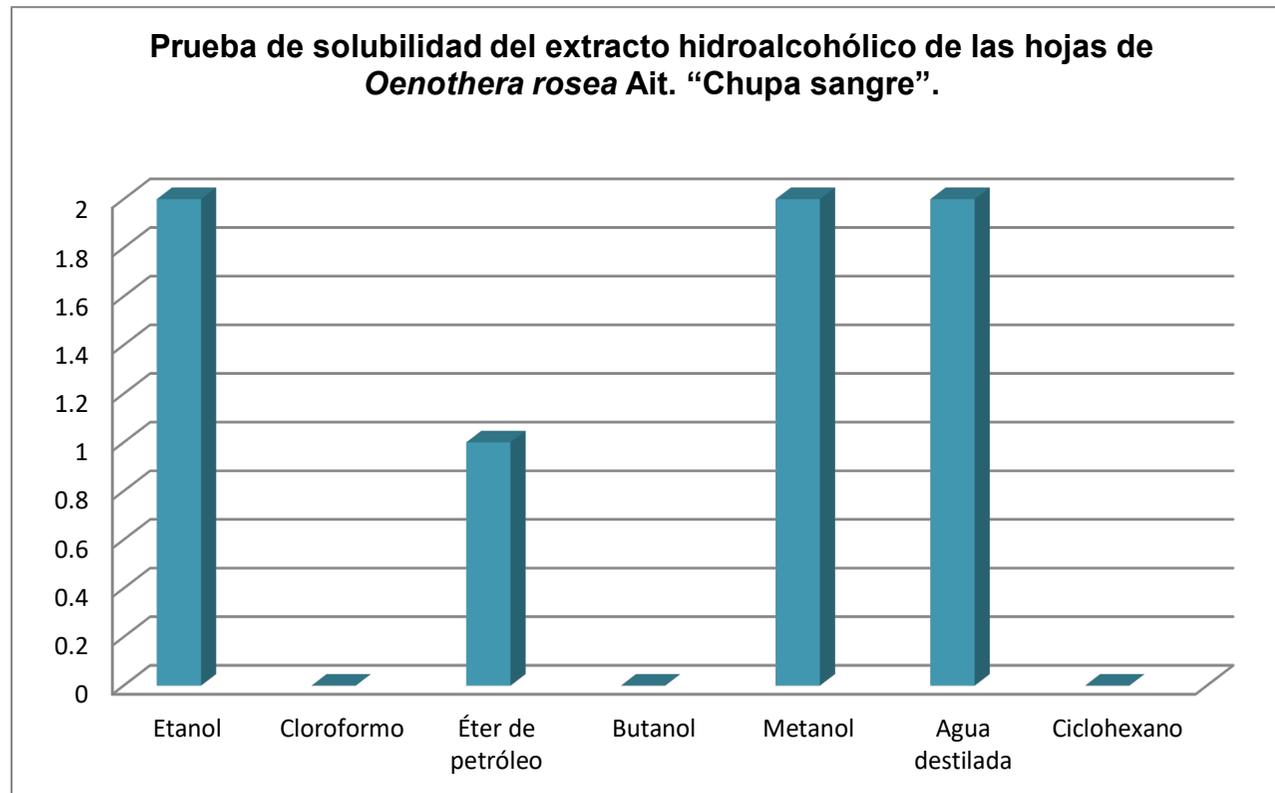


Figura 4. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre".

Interpretación: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" presenta solubilidad en etanol, éter de petróleo, metanol y agua destilada, y esto nos sirve para poder identificar con que solventes trabajaremos en los ensayos posteriores.

3.2. Análisis del perfil cualitativo fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”.

Tabla 6. Resultado del perfil cualitativo fitoquímico del extracto hidroalcohólico las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”.

Metabolito	Ensayo	Reacción Positiva	Resultado
Carbohidratos	Molish	Anillo Violeta	+
	Antrona	Coloración Verde	-
	Fehling	Coloración Rojo Ladrillo	-
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	Coloración Verde O Azul	+
Taninos	Gelatina	Precipitado Denso Blanco	+
Flavonoides	Shinoda	Coloración Rojo	+
Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim	Coloración Rojo Oscuro	-
Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina	Coloración Violácea	-
Alcaloides	Dragendorf	Precipitado Naranja	+
	Mayer	Precipitado Blanco	+
	Bertrand	Precipitado Blanco	-
	Sonnenschein	Precipitado Amarillo-Verdoso	-
Naftaquinonas, Antraquinonas Y Antranonas	Borntrager	Coloración Rojo	+
Triterpenoides Y Esteroides	Lieberman-Burchard	Coloración Verde Azulada	-
Saponinas	Generación De Espuma	Formación De Espuma	-
Glucósidos	Baljet	Coloración Anaranjada	-
Cumarinas	Nh ₄ oh Cc	Fluorescencia Celeste	-

Legenda: Presencia (+) Ausencia (-)



Figura 5. Análisis del perfil cualitativo fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait “Chupa sangre”.

Interpretación: En la figura 5 se observó la presencia de metabolitos primarios y secundarios entre ellos: carbohidratos, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides antraquinonas; referidos en la tabla 2.

3.3. Perfil de seguridad: HET CAM

Tabla 7. Recolección de datos de los controles (patrones) del método HET- CAM

Control	Tipo De Control	Tiempo De Reacción			Índice De Irritación	Clasificación
		Hemorragia	Lisis	Coagulación		
Suero Fisiologico	Blanco	301	301	301	0.03	No Irritante
		301	301	301	0.03	
		301	301	301	0.03	
Lauril Sulfato De Sodio	Control Positivo 1	109	117	149	7.52	Irritante Moderado
		107	119	148	7.51	
		108	118	147	7.52	
Hidroxido De Sodio	Control Positivo 2	21	107	149	9.22	Irritante Severo
		20	109	147	9.19	
		22	108	148	9.18	
Etanol	Solvente Usado	200	247	274	2.97	Irritante Leve
		202	245	276	2.99	
		201	246	275	2.98	

Tabla 8. Recolección de datos de los extractos de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” a diferentes concentraciones del método HET- CAM.

Extracto Alcohólico	Concentración	Tiempo De Reacción			Índice De Irritación	Clasificación
		Hemorragia	Lisis	Coagulación		
Hoja	5%	166	146	179	9.53	Irritante Severo
		165	148	177	9.56	
		166	147	178	9.53	
Hoja	2%	178	160	189	8.70	Irritante Moderado
		176	158	189	8.78	
		177	159	188	8.77	
Hoja	1%	252	218	246	4.40	Irritante Leve
		250	216	245	4.51	
		251	217	244	4.50	
Hoja	0,5%	204	287	279	2.60	Irritante Leve
		206	289	277	2.58	
		205	288	278	2.59	

Tabla 9. Recolección de datos de las fórmulas magistrales (gel) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” del método HET- CAM

Gel	Concentración	Tiempo			Índice De Irritación	Clasificación
		Hemorragia	Lisis	Coagulación		
Extracto	1,0 %	255	219	244	4,39	Irritante Leve
		256	217	246	4,36	Irritante Leve
		255	218	245	4.38	Irritante Leve
Extracto	0,5%	206	286	274	2.74	Irritante Leve
		204	284	276	2.76	Irritante Leve
		205	285	275	2.75	Irritante Leve

Tabla 10. Tratamiento estadístico resumen del tiempo de hemorragia, lisis y coagulación de los patrones en segundos.

Tratamiento	N	Hemorragia		Lisis		Coagulación		Índice de irritación	
		Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.
Suero Fisiológico	3	301,0	0,00	301,0	0,00	301,0	0,00	0,03	0,00
Lauril sulfato de sodio	3	108,0	1,00	118,0	1,00	148,0	1,00	7,52	0,01
Hidróxido de sodio	3	21,0	1,00	108,0	1,00	148,0	1,00	9,20	0,02
Etanol	3	201,0	1,00	246,0	1,00	275,0	1,00	2,98	0,01

Interpretación: La tabla 10 nos indica que en menor tiempo de hemorragia se observó para el hidróxido de sodio (21 segundos) este mismo grupo reportó el menor tiempo de lisis (108 segundos), en cuanto al tiempo de coagulación tanto el grupo tratado con Hidróxido de sodio y el tratado con Lauril sulfato de sodio presentaron los menores tiempos promedios (148 segundos).

La última columna nos indica los valores promedios del índice de irritación, en cabeza de lista el hidróxido de sodio con un valor de 9,20 seguido del Lauril sulfato de sodio con 7,52. (ver figura 7.)

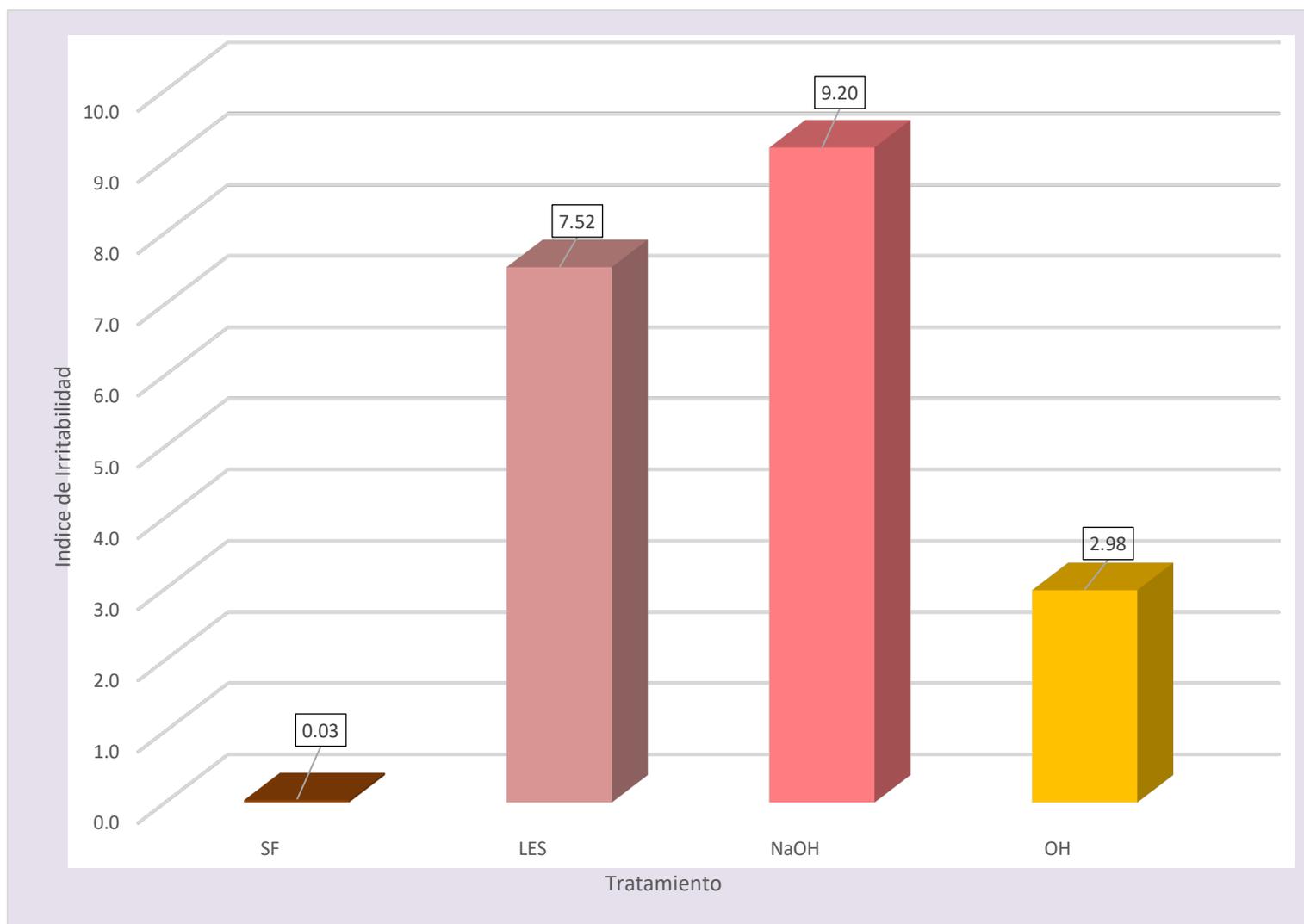


Figura 6. Valores promedio del índice de irritabilidad por tratamiento patrón.

Tabla 11. Distribución de las muestras según su categoría de irritabilidad de los controles (patrones).

Tratamiento	Categoría de irritabilidad				Total
	No irritante	Irritante leve	Irritante moderado	Irritante severo	
Suero Fisiológico	3	0	0	0	3
Lauril sulfato de sodio	0	0	3	0	3
Hidróxido de sodio	0	0	0	3	3
Etanol	0	3	0	0	3
Total	3	3	3	3	12

Interpretación: La tabla 11 nos indica que luego de categorizar el índice de irritabilidad el suero fisiológico se clasifica como irritante, seguido del etanol como irritante leve, Lauril sulfato de sodio como irritante moderado y finalmente el hidróxido de sodio como irritante severo.

Tabla 12. Tratamiento estadístico resumen del tiempo de hemorragia, lisis y coagulación en segundos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” por concentración.

Tratamiento	N	Hemorragia		Lisis		Coagulación		Índice de irritación	
		Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.
Extracto 0,5%	3	205,0	1,00	288,0	1,00	278,0	1,00	2,59	0,01
Extracto 1%	3	251,0	1,00	217,0	1,00	245,0	1,00	4,47	0,06
Extracto 2%	3	177,0	1,00	159,0	1,00	188,7	0,58	8,75	0,04
Extracto 5%	3	165,7	0,58	147,0	1,00	178,0	1,00	9,54	0,02

Interpretación: Al observar los resultados por triplicado de los tiempos de hemorragia, lisis y coagulación se pudo determinar el índice de irritación de los extractos a diferentes concentraciones, el extracto al 5% presentó El mayor índice de irritación (9,54) cuyo tiempo promedio de hemorragia fue el menor de todos con 165,7 segundos, también con los menores tiempo promedio de lisis 147 segundos y coagulación con 178 segundos. Por el contrario, el extracto al 0,5% de concentración presentó el menor índice de irritación (2,59) con tiempo promedio de hemorragia de 205,0 segundos y los mayores tiempos promedio del lisis y coagulación 288,0 y 278,0 Segundos respectivamente.

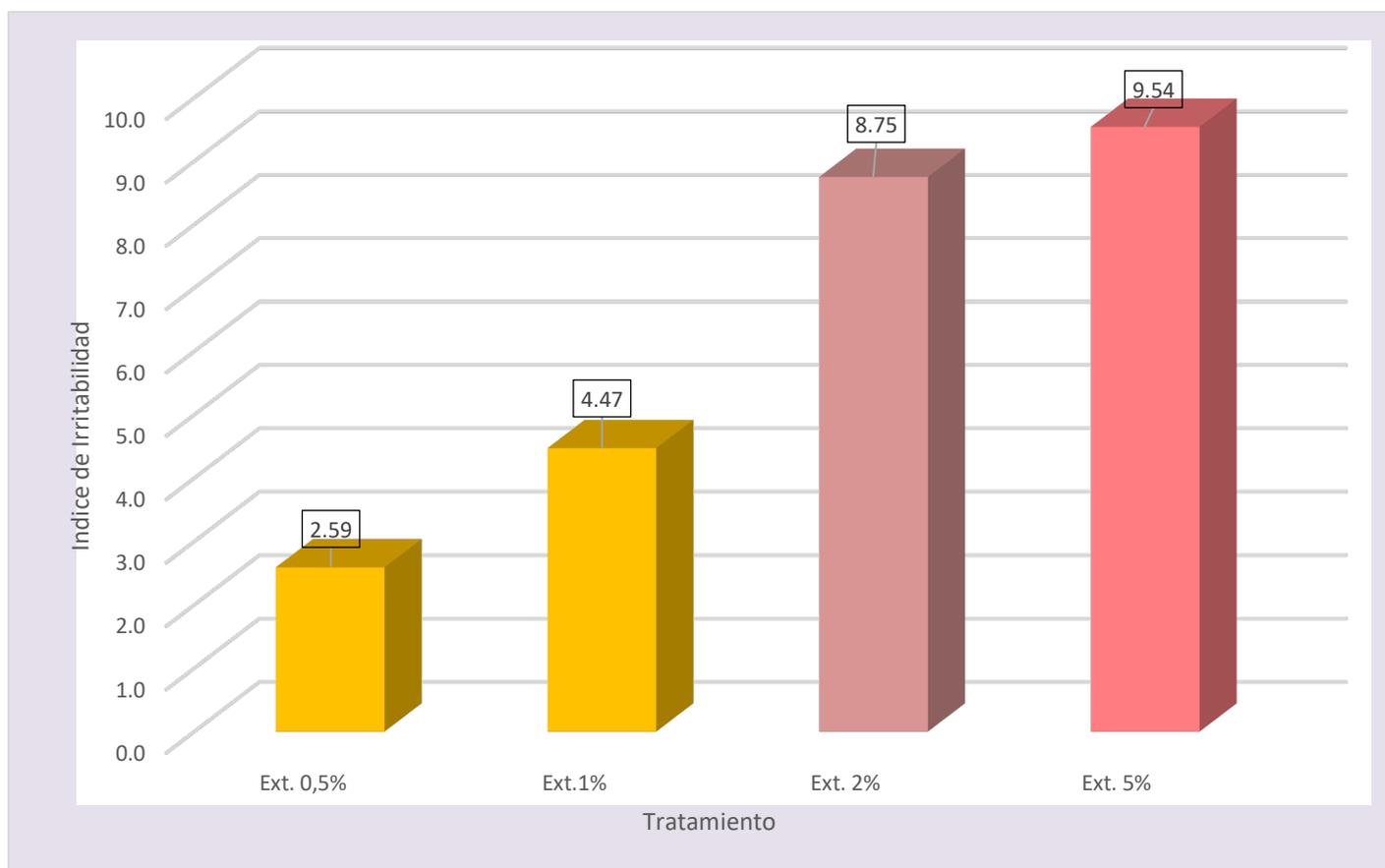


Figura 7. Valores promedio del índice de irritabilidad de los extractos hidroalcohólico hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” al 0,5; 1,2 y 5%..

Tabla 13. Distribución de las muestras de extracto Hidroalcohólico de hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” según categoría de irritabilidad por concentración.

Tratamiento	Categoría de irritabilidad				Total
	No irritante	Irritante leve	Irritante moderado	Irritante severo	
Extracto 0,5%	0	3	0	0	3
Extracto 1%	0	3	0	0	3
Extracto 2%	0	0	3	0	3
Extracto 5%	0	0	0	3	3
Total	0	6	3	3	12

Interpretación: Luego de clasificar los extractos según índice de irritabilidad se categorizó a los extractos a 0,5% como irritante leve, el extracto al 2% como irritante moderado y finalmente el extracto al 5% como irritante severo.

Tabla 14. Tratamiento estadístico del tiempo de hemorragia, lisis y coagulación del gel elaborado con el extracto Hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” en segundos.

Tratamiento	N	Hemorragia		Lisis		Coagulación		Índice de irritación	
		Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.
		Gel 0.5%	3	205,0	1,00	286,0	1,00	277,3	3,06
Gel 1%	3	255,3	0,58	218,0	1,00	245,0	1,00	4,38	0,02

Interpretación: En la tabla 14 se muestra el valor promedio y la desviación estándar del tiempo de hemorragia, lisis y coagulación en los geles elaborados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” al 0,5% y 1,0% de concentración, obteniendo un índice de irritación de 2,66 para el gel al 0,5% y de 4,38 para el gel al 1%.

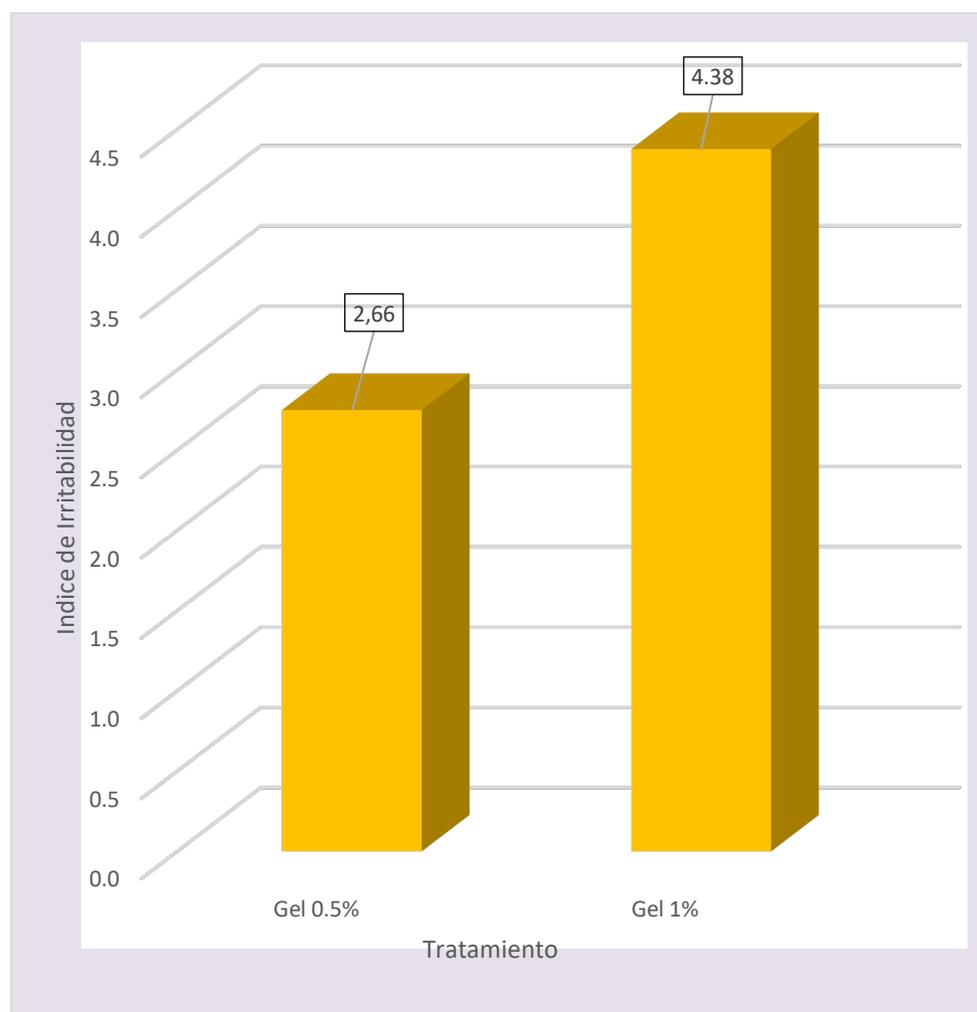


Figura 8. Valores promedio del índice de irritabilidad de los geles al 0,5 y 1 % realizados a base a extractos hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” por concentración.

Tabla 15. Distribución de los geles con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” según categoría de irritabilidad por concentración.

Tratamiento	Categoría de irritabilidad				Total
	No irritante	Irritante leve	Irritante moderado	Irritante severo	
Gel 0.5%	0	3	0	0	3
Gel 1%	0	3	0	0	3
Total	0	6	0	0	6

Interpretación: En la tabla 15 muestra que las 3 repeticiones tanto para el gel al 5% como al 1% los clasifican ambos como irritantes leves.

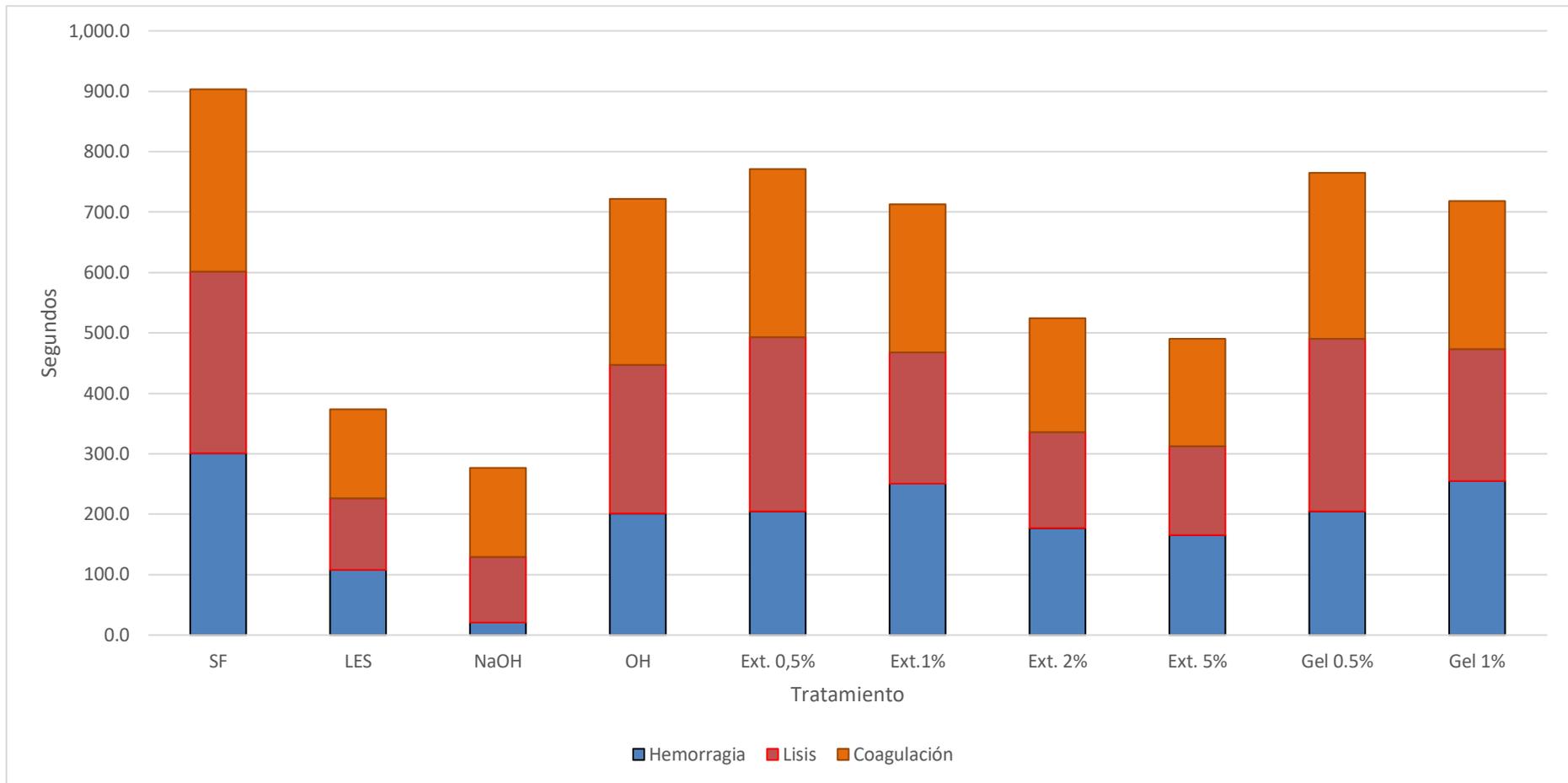


Figura 9. Distribución de los tiempos de hemorrage lisis y coagulación por tratamiento.

Interpretación: La figura 10 nos permite evidenciar que los extractos al 0,5 y 1% hidroalcohólicos y los geles a las mismas concentraciones presenta los mayores tiempos en evidenciarse la hemorrage y coagulación.

Tabla 16. Prueba de homogeneidad de varianzas del índice de irritabilidad entre grupos (suero fisiológico y extractos al 0,5; 1; 2 y 5%).

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Índice de irritación	3,697	9	20	0,007

Interpretación: La tabla 16 presenta la prueba de homogeneidad de varianzas, esta condición es un requisito para la aplicación de una prueba ANOVA

Ho: Las varianzas de los 5 grupos son iguales (Control negativo; 0,5; 1,0; 2,0 5,0%)

H1: Al menos uno de los 5 grupos tiene varianza diferente.

Criterio:

Si el p valor es menor a 0,05 se rechaza Ho y se acepta H1.

Si el p valor es mayor a 0,05 no se puede rechazar H0.

Como el p valor de la prueba es menor a 0,05 se rechaza Ho y podemos concluir que los grupos presentan dispersiones heterogéneas, por tanto, no podemos usar una prueba ANOVA, en su lugar usaremos una prueba no paramétrica.

Tabla 17. Prueba de Kruskal Wallis: Comparación de índice de irritabilidad del suero fisiológico y extractos al 0,5; 1; 2 y 5%.

	Índice de irritación
H de Kruskal-Wallis	13,622
GI	4
p valor	0,009

Interpretación:

Ho: La distribución del índice de irritabilidad es igual en los 5 grupos.

H1: Al menos uno de los grupos presenta una distribución del índice de irritabilidad diferente.

La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis proporcionada por el SPSS arroja un p valor menor a 0,05 (p valor = 0,009), por lo cual se rechaza Ho y se puede concluir que existen diferencias significativas entre el índice de irritabilidad estos tratamientos.

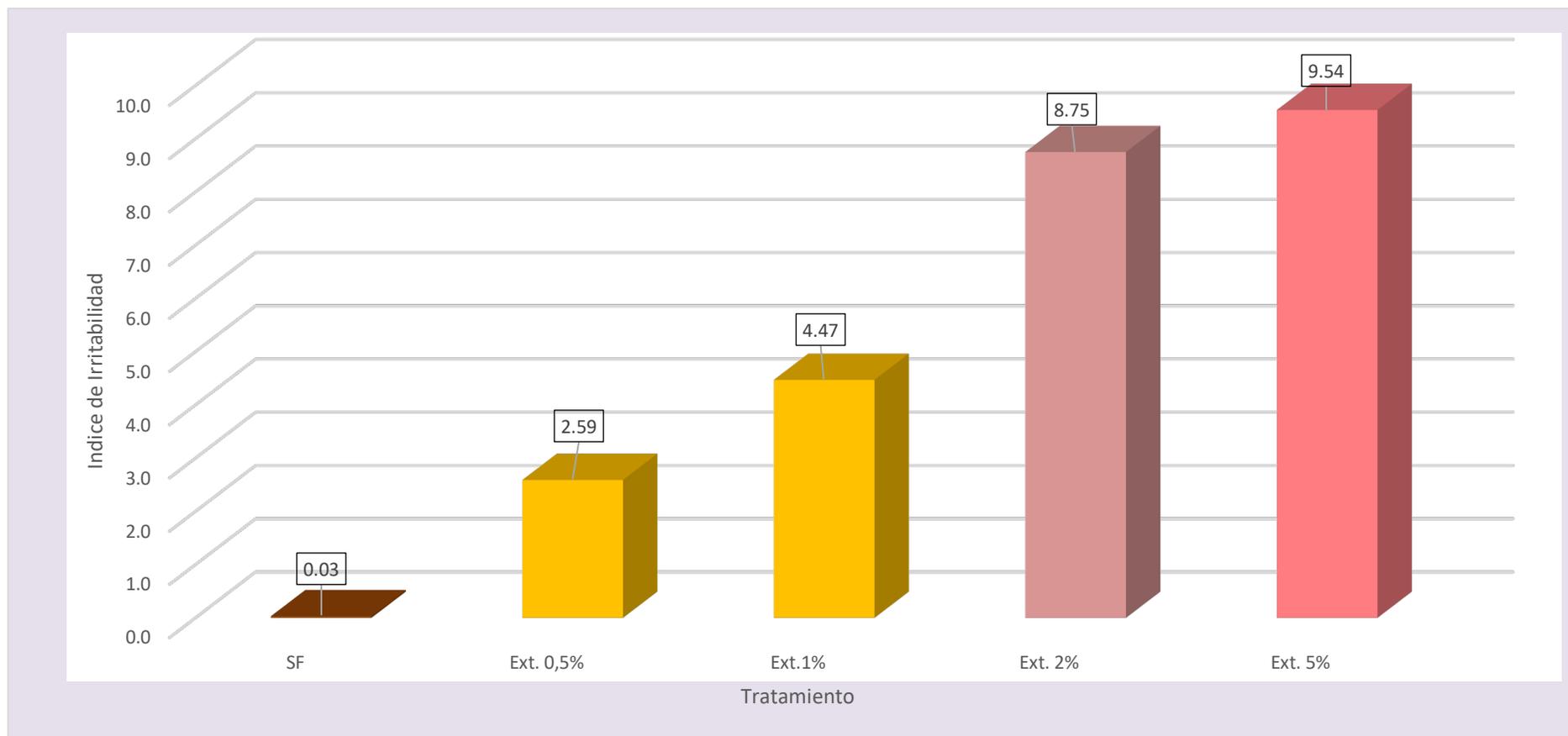


Figura 10. Distribución del índice de irritabilidad por tratamiento.

Interpretación: La figura 10 permite consolidar los promedios de los índices de irritabilidad y su categoría correspondiente, los grupos de rojo corresponden irritabilidad severa, las barras marrones a irritantes moderados, los amarillos irritantes leves y finalmente el verde a no irritante.

Tabla 18. Games-Howell variable dependiente: Índice de irritación del suero fisiológico y extractos al 0,5; 1; 2 y 5 %.

(I) Tratamiento Tratamiento	(J)	Diferencia de medias (I-J)	p valor
SF	Ext. 0,5%	-2,56*	0,000
	Ext.1%	-4,44*	0,000
	Ext. 2%	-8,72*	0,000
	Ext. 5%	-9,51*	0,000
Ext. 0,5%	Ext.1%	-1,88*	0,001
	Ext. 2%	-6,16*	0,000
	Ext. 5%	-6,95*	0,000
Ext.1%	Ext. 2%	-4,28*	0,000
	Ext. 5%	-5,07*	0,000
Ext. 2%	Ext. 5%	-,79*	0,001

Ho: El tratamiento I es igual al tratamiento J.

H1: El tratamiento I es diferente al tratamiento J.

Criterio: Si el p valor es menor a 0,05 se rechaza Ho y se acepta H1.

Si el p valor es mayor a 0,05 no se puede rechazar H0.

Al comparar el suero fisiológico versus nuestros extractos podemos concluir que todos presentan un grado de irritabilidad diferente al grupo control (p valor <0,05). En el extracto al 0,5% vemos que su de irritabilidad es estadísticamente diferente a cada uno de los extractos al 1; 2 y 5 % la diferencia negativa indica que el extracto al 0,5% tiene una menor irritabilidad.

De manera similar al realizar la comparación del extracto al 1%, se llega a la conclusión de que su irritabilidad es diferente (menor) a los extractos al 2 y 5%. Finalmente, el extracto al 2% presenta un índice de irritabilidad diferente (menor) al extracto al 5%.

Tabla 19. Games-Howell variable dependiente: Índice de irritabilidad de extractos al 0,5 y 1 % y los geles al 0,5 y 1 %.

	Índice de irritación
H de Kruskal-Wallis	9,46
GI	3
Sig. Asintótica	0,024

Interpretación: La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis proporcionada por el SPSS arroja un p valor menor a 0,05 (p valor = 0,024), por lo cual se puede concluir que existen diferencias significativas entre el índice de irritabilidad estos 4 tratamientos.

Tabla 20. Games-Howell variable dependiente: Índice de irritabilidad de extractos al 0,5 y 1 % y los geles al 0,5 y 1 %.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Ext. 0,5%	Ext. 1%	-1,88*	0,001
	Gel 0,5%	-0,07	0,620
	Gel 1%	-1,79*	0,000
Ext. 1%	Gel 0,5%	1,81*	0,000
	Gel 1%	0,09	0,265
Gel 0.5%	Gel 1%	-1,72*	0,002

Interpretación: Al comparar el extracto al 0,5% vemos que su de irritabilidad es estadísticamente diferente al extracto al 1 % y también al gel a 1%. La diferencia negativa indica que el extracto al 0,5% tiene una menor irritabilidad en comparación a estos dos tratamientos. Sin embargo, no presenta una diferencia en el índice de irritabilidad en comparación al gel a 0,5% de concentración.

De manera similar al realizar la comparación del extracto al 1%, se llega a la conclusión de que su irritabilidad es diferente (mayor) al gel a 0,5%, pero comparable al gel a 1%. Demostrando que el gel al 0,5% presenta un índice de irritabilidad diferente (menor) al gel a 1%.

Finalmente, si bien se ha mostrado que el gel y extractos de 1% y 0,5% pertenecen a la categoría de irritante leve su índice de irritación es significativamente menor en el caso de los extractos al 0,5 % y significativamente mayor en los extractos al 1%.

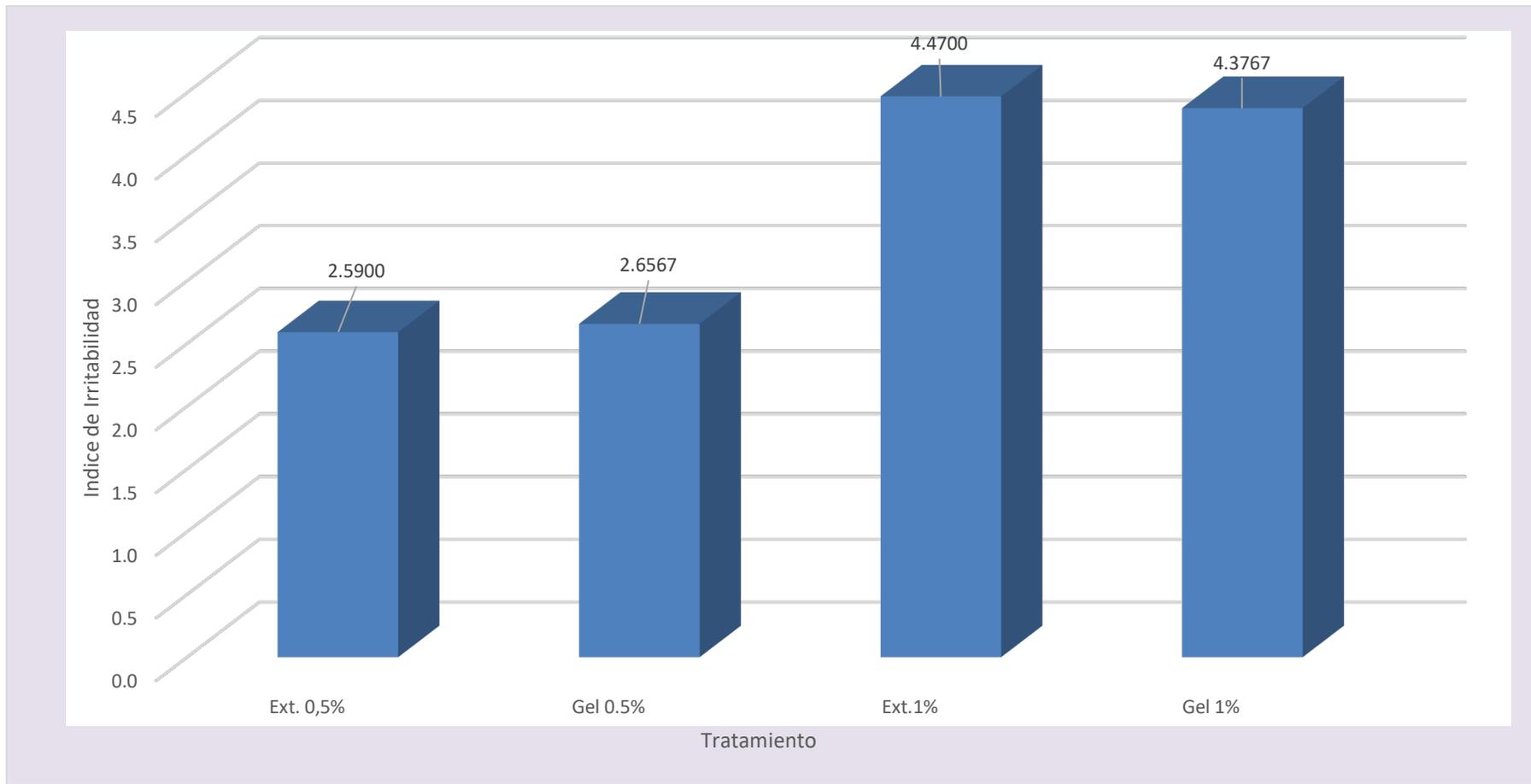


Figura 11. Índice de irritabilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”

3.4. Análisis del efecto cicatrizante de las formulaciones magistrales (geles) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”

Tabla 21. Recolección de datos de la actividad cicatrizante (mm)

Datos		Área de cierre de herida (mm)					
Tratamiento	N° de rata macho	Incisión	0 días	7 días	14 días	21 días	28 días
Control negativo	1	Área	10	9,7	9,12	8,19	6,97
	2	Área	9,9	9,51	9,12	8,19	7,05
	3	Área	10	9,8	8,93	8,19	7,06
	4	Área	9,9	9,12	8,65	7,92	7,1
	5	Área	9,9	9,6	9,31	8,46	7,39
	6	Área	9,9	9,3	8,5	7,7	6,6
	7	Área	9,9	9,5	9	8	7
	8	Área	10	9,7	9,2	8,3	7,5
Gel al 0,5%	1	Área	9,9	9,6	6,08	3,62	2,11
	2	Área	9,9	9,22	6,64	3,02	2,24
	3	Área	10	9,31	6,01	3,75	2,3
	4	Área	9,9	9,22	6,32	4,09	2,45
	5	Área	9,9	9,41	6,4	3,66	2,6
	6	Área	9,9	9,22	6,64	3,33	2,24
	7	Área	10	9,31	6,01	3,9	2,3
	8	Área	9,9	9,41	6,4	3,5	2,6
Gel al 1,0%	1	Área	9,9	9,41	7,92	3,48	1,76
	2	Área	10	9,42	7,92	3,6	1,77
	3	Área	9,9	9,31	7,65	3,8	1,85
	4	Área	9,9	9,58	7,39	3,9	1,9
	5	Área	10	9,7	7,83	3,47	2,02
	6	Área	9,9	9,45	7,92	3,7	1,78
	7	Área	9,9	9,55	7,92	3,75	1,8
	8	Área	9,9	9,6	7,39	3,9	1,95
Cicatricure	1	Área	10	8,62	0,25	0,01	0,01
	2	Área	10	8,4	0,38	0,35	0,04
	3	Área	9,9	8,77	0,4	0,13	0,04
	4	Área	10	9,02	0,42	0,5	0,04
	5	Área	9,95	8,54	0,4	0,6	0,05
	6	Área	10	8,46	0,8	0,6	0,1
	7	Área	10	8,8	0,42	0,4	0,13
	8	Área	9,9	8,28	0,36	0,55	0,16

Tabla 22. Evolución de la cicatrización, cierre de la herida (mm)

	Tratamiento	N	Media	Desviación. Estándar	Mínimo	Máximo
Diámetro día 0	Control negativo	8	9,94	0,05	9,90	10,00
	Gel al 0,5%	8	9,93	0,05	9,90	10,00
	Gel al 1,0%	8	9,93	0,05	9,90	10,00
	Cicatricure	8	9,97	0,05	9,90	10,00
Diámetro día 7	Control negativo	8	9,53	0,23	9,12	9,80
	Gel al 0,5%	8	9,34	0,13	9,22	9,60
	Gel al 1,0%	8	9,50	0,13	9,31	9,70
	Cicatricure	8	8,61	0,24	8,28	9,02
Diámetro día 14	Control negativo	8	8,98	0,28	8,50	9,31
	Gel al 0,5%	8	6,31	0,26	6,01	6,64
	Gel al 1,0%	8	7,74	0,24	7,39	7,92
	Cicatricure	8	0,43	0,16	0,25	0,80
Diámetro día 21	Control negativo	8	8,12	0,24	7,70	8,46
	Gel al 0,5%	8	3,61	0,33	3,02	4,09
	Gel al 1,0%	8	3,70	0,17	3,47	3,90
	Cicatricure	8	0,39	0,22	0,01	0,60
Diámetro día 28	Control negativo	8	7,08	0,27	6,60	7,50
	Gel al 0,5%	8	2,36	0,18	2,11	2,60
	Gel al 1,0%	8	1,85	0,10	1,76	2,02
	Cicatricure	8	0,07	0,05	0,01	0,16

Interpretación: La tabla 22 presenta las estadísticas resumen de la actividad cicatrizante la cual fue cuantificada mediante diámetro cierre de la herida. Al finalizar el experimento día 28 el grupo control presentó un diámetro 7,08 milímetros mientras el grupo tratado como el Gel elaborado con el extracto hidroalcohólico hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre” al 1% presentó diámetro de 1,85 milímetros. La tabla también presenta las desviaciones estándar de los grupos, observándose en el día 28 que el grupo más heterogéneo fue el del control negativo mientras que el más homogéneo fue el grupo tratado con Cicatricure. Además, también se presenta los valores extremos en los 5 días de observación.

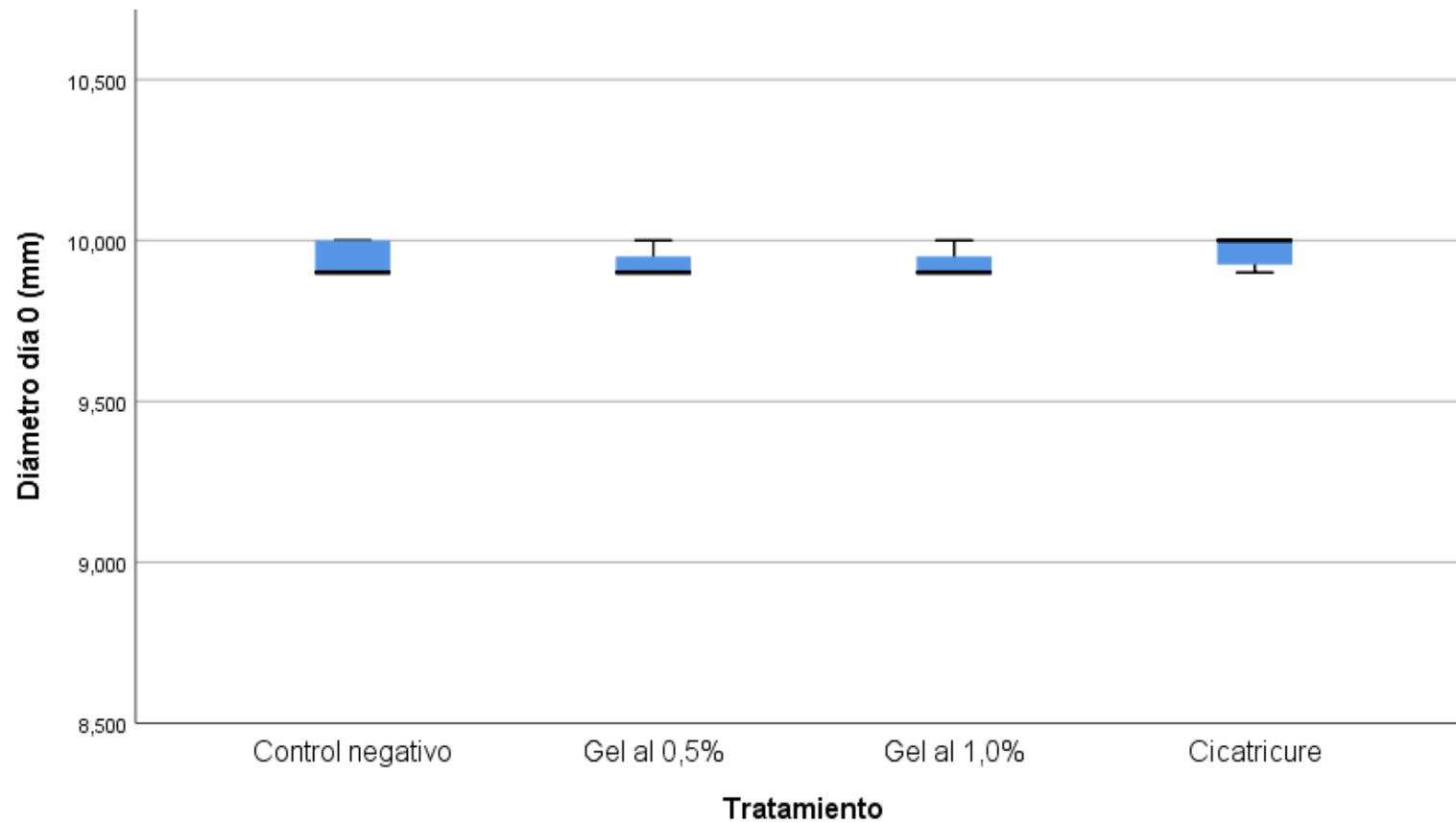


Figura 12. Distribución de los valores de cierre de herida al inicio del experimento (día 0)

Interpretación: El diagrama de cajas de la figura 12 muestra que al inicio del experimento los diámetros de las heridas estaban alrededor de 10 milímetros, con una ligera mayor variabilidad (amplitud de caja) en el grupo control.

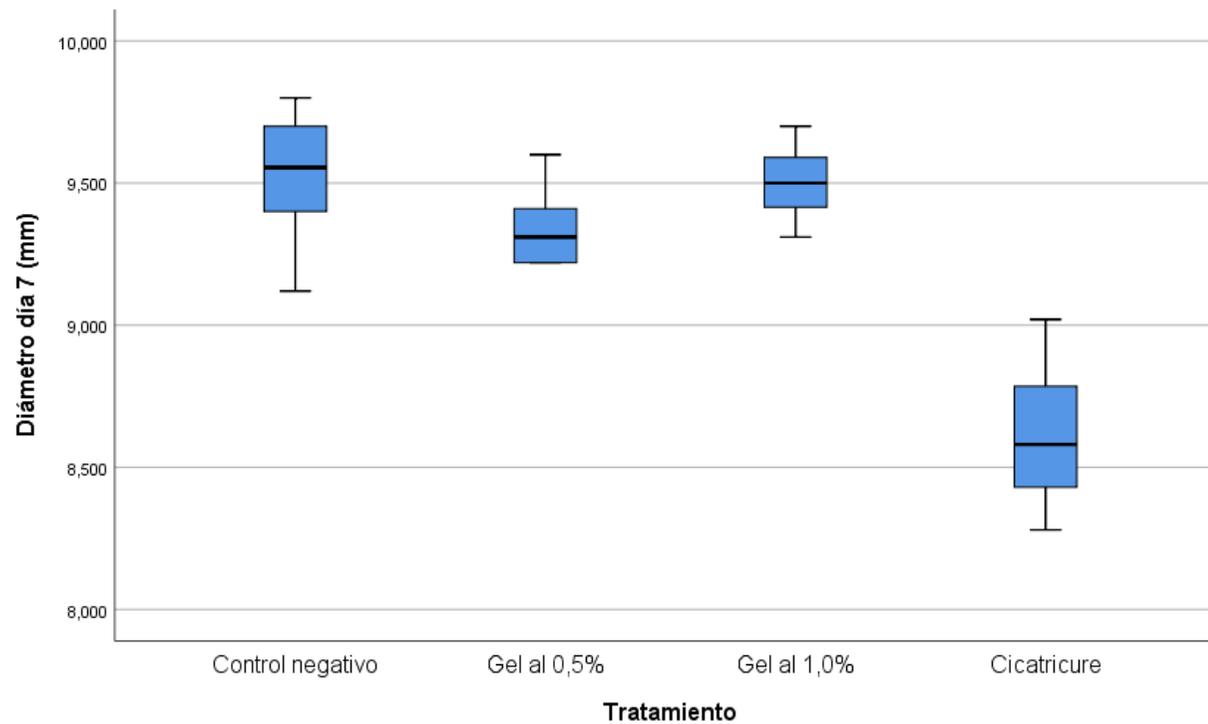


Figura 13. Distribución de los valores de cierre de herida a 7 días de iniciado el experimento.

Interpretación: El diagrama de la figura 13 muestra que los diámetros de las heridas tratadas con Cicatricure eran las menores, además la variabilidad de los grupos (amplitud de las cajas) son muy similares. No se observa presencia de dos datos atípicos y la simetría de las cajas sugiere una normalidad de las mediciones.

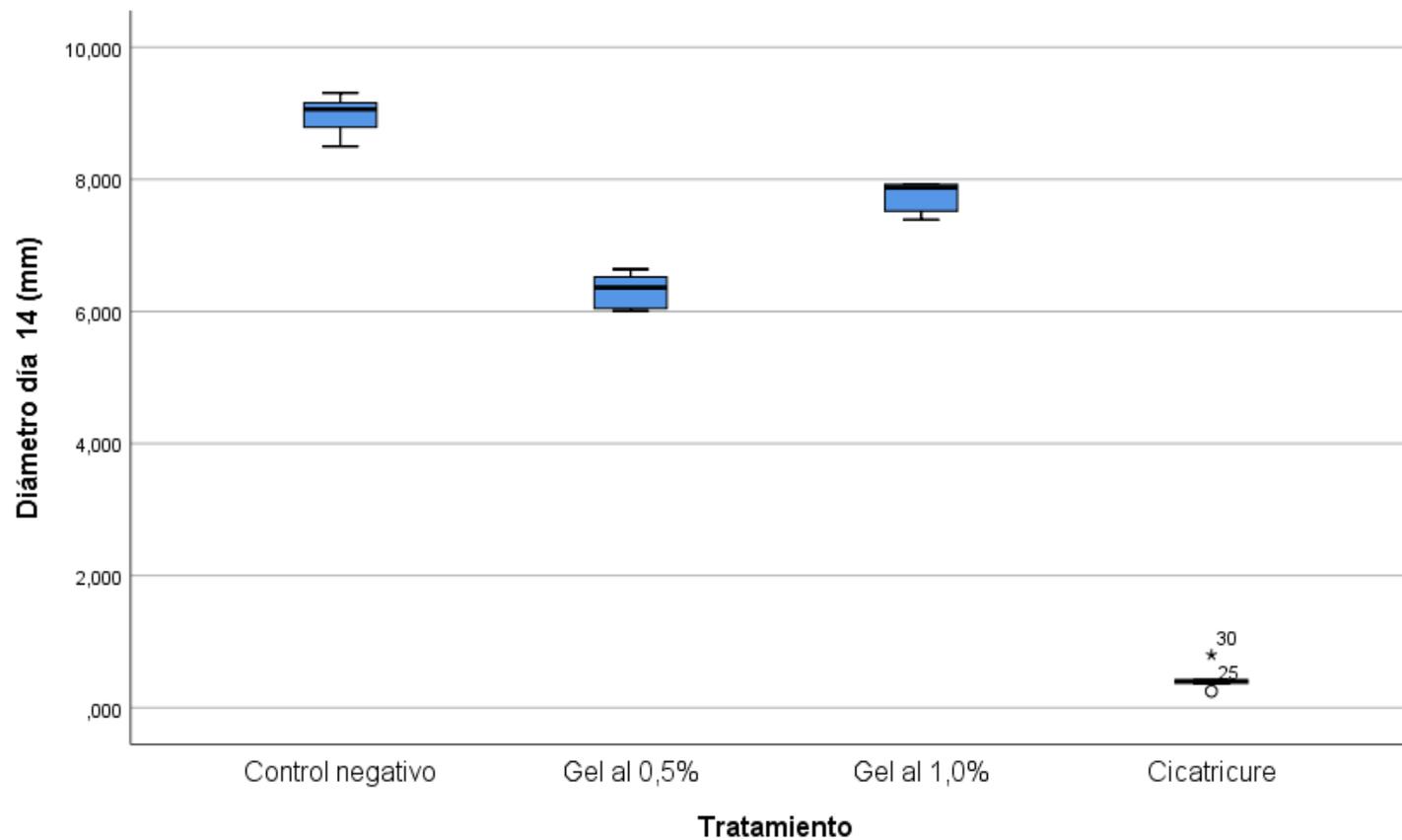


Figura 14. Distribución de los valores de cierre de herida a 14 días de iniciado el experimento.

Interpretación: El diagrama de cajas de la figura 14 muestra que los diámetros de las heridas tratadas con Cicatricure eran las menores y las más homogéneas, mientras que en el caso del grupo control los diámetros son mayores. Se observa la presencia de algunos datos atípicos en el grupo tratado con Cicatricure.

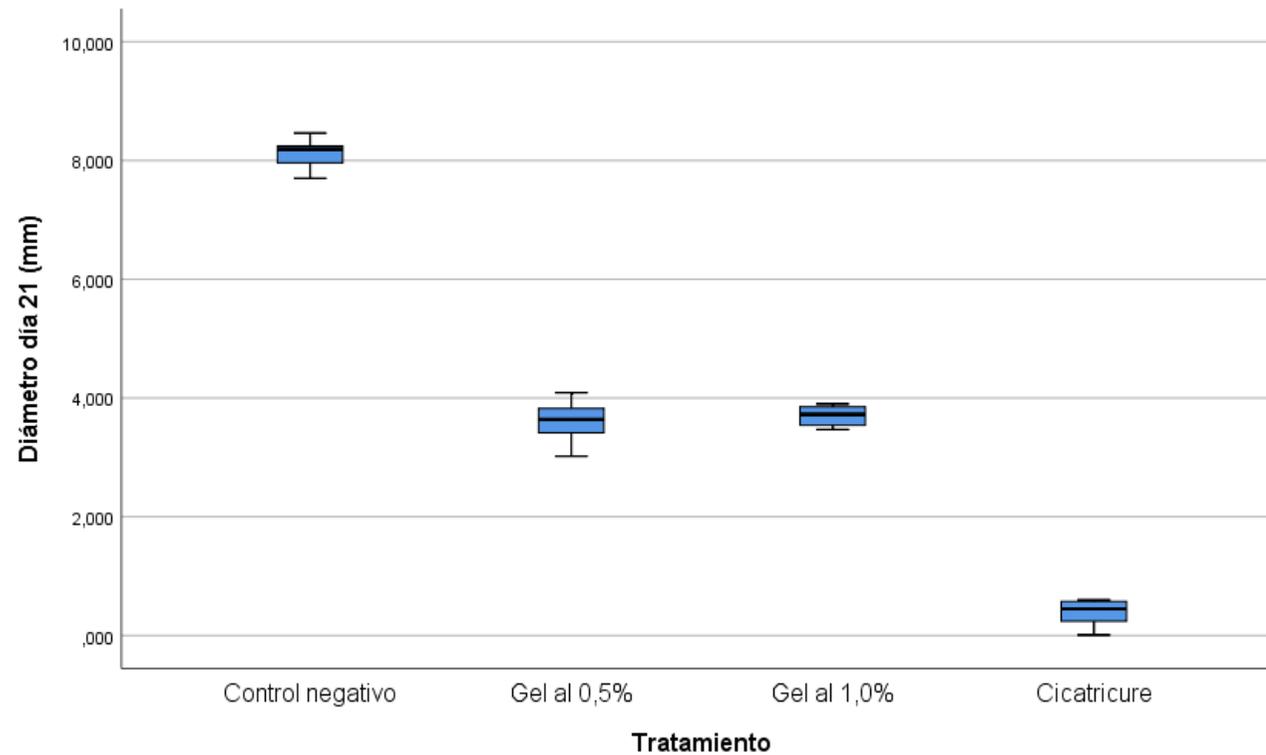


Figura 15. Distribución de los valores de cierre de herida a 21 días de iniciado el experimento.

Interpretación: El diagrama de cajas de la figura 15 muestra que, en el día 21 las mediciones se alejan bastante del grupo control negativo, los diámetros de las heridas tratadas con Cicatricure son las menores, mientras que en el caso del grupo control los diámetros son mayores. Las heridas tratadas con Gel al 0,5 y 1,0% presentan valores intermedios. No se observa la presencia de datos atípicos.

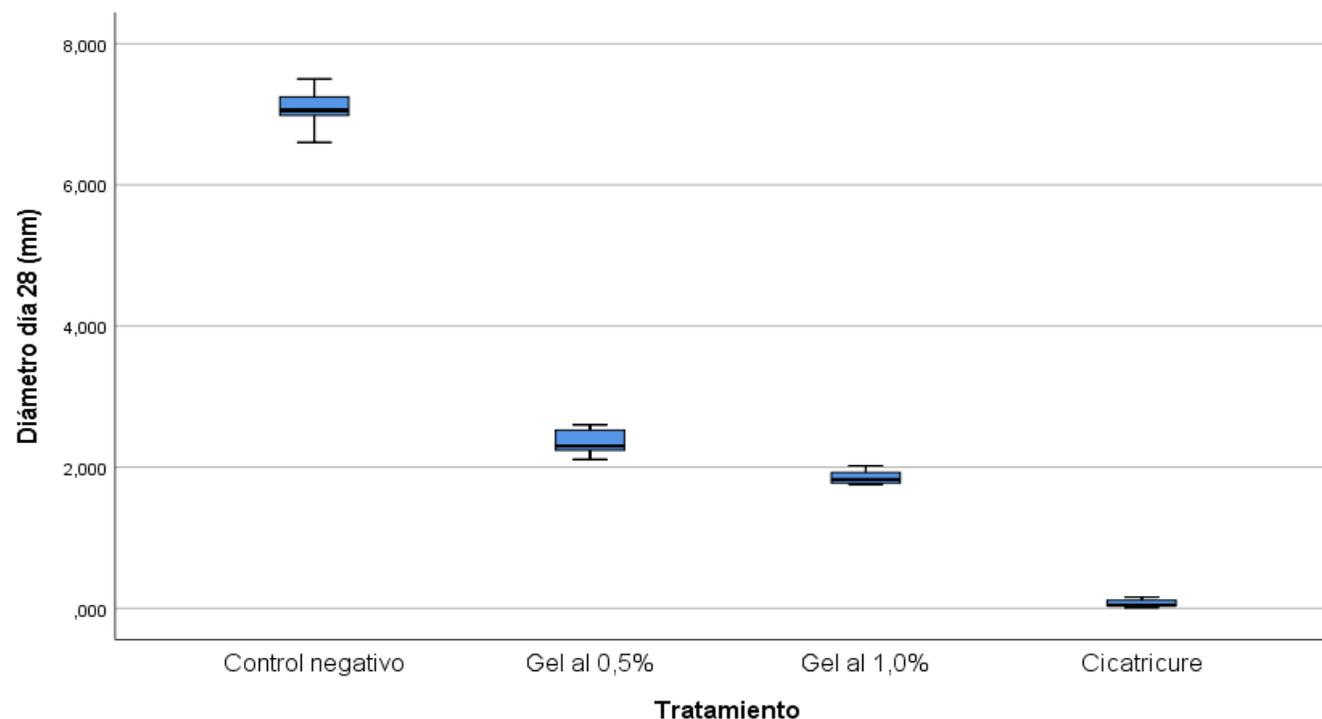


Figura 16. Distribución de los valores de cierre de herida a 28 días de iniciado el experimento.

Interpretación: El diagrama de cajas de la figura 16 muestra que, al finalizar el experimento en el día 28 los diámetros de las heridas tratadas con Cicatricure fueron las más homogéneas y con valores muy cercanas a 0,00 mm, mientras que en el caso del grupo control los diámetros están en torno a los 7mm. Por otro lado, las heridas tratadas con Gel al 0,5 y 1 % presentan valores cercanos a los 2mm. No se observa la presencia de datos atípicos.

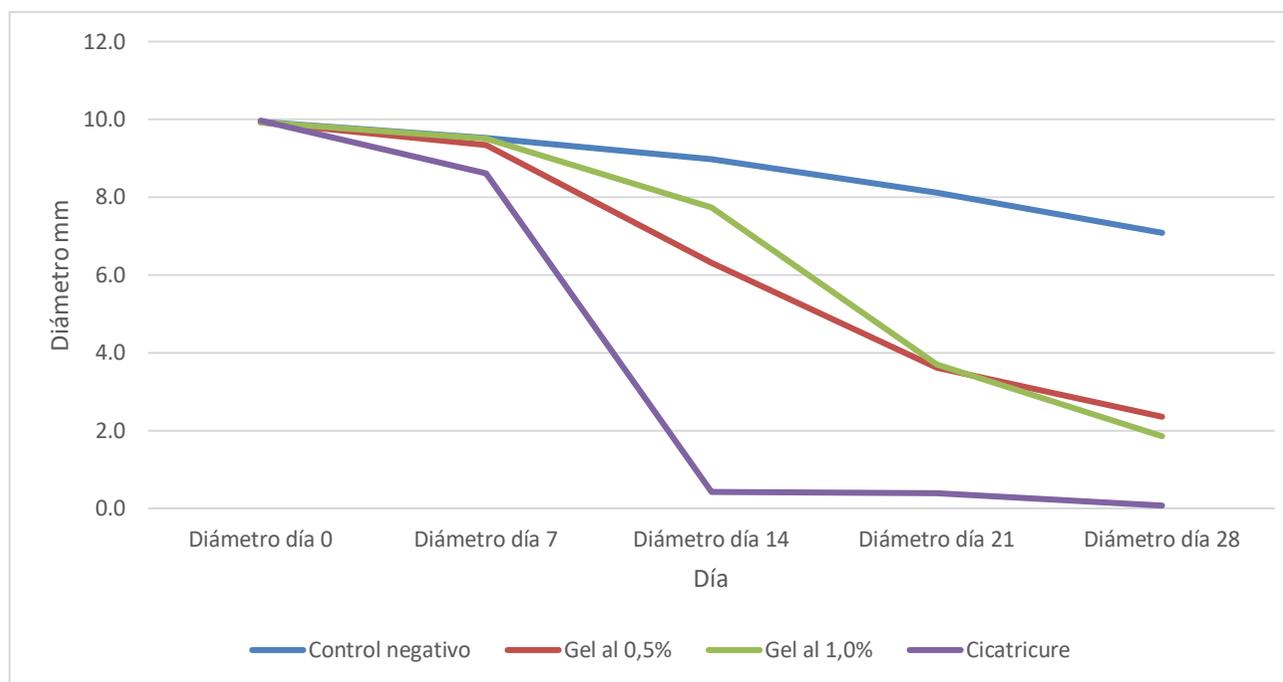


Figura 17. Evolución del diámetro del cierre de la herida incisa en las cepas biológicas.

Interpretación: La figura 17 presenta la evolución del cierre de la herida durante los días de seguimiento (días 0, 7, 14, 21 y 28). Observamos que conforme pasan los días, los diámetros disminuyen, pero a diferente velocidad, en el caso del grupo control la disminución es más lenta en comparación con el grupo patrón (Cicatricure) el cual disminuye de manera rápida mostrando un promedio disminuido a partir del día 14. En el caso de los grupos tratados con el Gel elaborado con el extracto Hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" al 1%, la disminución es intermedia pero constante mostrando un diámetro reducido el día 28.

Tabla 23. Prueba de Homogeneidad de varianzas del diámetro de cierre de la herida entre grupos.

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	p valor
Diámetro día 0	0,405	3	28	0,751
Diámetro día 7	1,537	3	28	0,227
Diámetro día 14	1,585	3	28	0,215
Diámetro día 21	0,766	3	28	0,523
Diámetro día 28	2,866	3	28	0,054

Interpretación: La tabla 23 presenta la prueba de homogeneidad de varianzas, esta condición es un requisito para la aplicación de una prueba ANOVA.

Ho: Las varianzas de los 4 grupos son iguales (Homogéneas)

H1: Al menos uno de los 4 grupos tiene varianza diferente (Heterogéneas).

Criterio:

Si el p valor es menor a 0,05 se rechaza Ho y se acepta H1.

Si el p valor es mayor a 0,05 no se puede rechazar Ho.

Como el p valor de la prueba es mayor a 0,05 podemos concluir que los grupos presentan dispersiones homogéneas, por tanto, podemos usar una prueba ANOVA, la cual se presenta a continuación.

Tabla 24. Prueba de Homogeneidad de varianzas del diámetro de cierre de la herida entre grupos.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p valor
Diámetro día 0 (mm)	Entre grupos	0,01	3	0,00	1,51	0,235
	Dentro de grupos	0,06	28	0,00		
	Total	0,07	31			
Diámetro día 7 (mm)	Entre grupos	4,46	3	1,49	41,49	0,000
	Dentro de grupos	1,00	28	0,04		
	Total	5,46	31			
Diámetro día 14 (mm)	Entre grupos	343,79	3	114,60	2037,17	0,000
	Dentro de grupos	1,58	28	0,06		
	Total	345,36	31			
Diámetro día 21 (mm)	Entre grupos	241,71	3	80,57	1317,61	0,000
	Dentro de grupos	1,71	28	0,06		
	Total	243,42	31			
Diámetro día 28 (mm)	Entre grupos	215,07	3	71,69	2427,01	0,000
	Dentro de grupos	0,83	28	0,03		
	Total	215,89	31			

Interpretación:

La tabla 24 nos presenta la salida del SPSS para la prueba ANOVA, la cual tiene como hipótesis estadísticas:

Ho: Los promedios del diámetro del cierre de las heridas son iguales.

H1: Al menos uno de los promedios del diámetro del cierre de herida es diferente.

Criterio:

Si el p valor es menor a 0,05 se rechaza Ho y se acepta H1.

Si el p valor es mayor a 0,05 no se puede rechazar H.

Como el p valor es menor a 0,05 se puede concluir que existe una diferencia significativa entre los promedios del diámetro del cierre de las heridas en los días 7, 14, 21 y 28.

Tabla 25. Comparaciones múltiples Tukey de la actividad cicatrizante.

	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
Diámetro día 7	Cicatricure	5	8,61			
	Gel al 0,5%	5		9,34		
	Gel al 1,0%	5		9,50		
	Control negativo	5		9,53		
	Sig.		1,00	0,20		
Diámetro día 14	Cicatricure	5	0,43			
	Gel al 0,5%	5		6,31		
	Gel al 1,0%	5			7,74	
	Control negativo	5				8,98
	Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00
Diámetro día 21	Cicatricure	5	0,39			
	Gel al 1,0%	5		3,61		
	Gel al 0,5%	5		3,70		
	Control negativo	5			8,12	
	Sig.		1,00	0,88	1,00	
Diámetro día 28	Cicatricure	5	0,07			
	Gel al 1,0%	5		1,85		
	Gel al 0,5%	5			2,36	
	Control negativo	5				7,08
	Sig.		1,00	1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Interpretación: La tabla 25 presenta la comparación de los grupos mediante las comparaciones múltiples de Tukey.

Según lo observado podemos indicar que en el día 07 el Gel elaborado con el extracto hidroalcohólico hojas de *Oenothera rosea* Ait. Chupa sangre en concentraciones de 0,5 y 1,0% no presenta efectos estadísticamente diferentes al grupo control, únicamente el Cicatricure presenta un promedio diferente al resto. A partir del 14 los extractos a 0,5 y 1,0 % se separan del grupo control en otro subconjunto lo cual indica que presentan efecto cicatrizante significativo.

El día 21 ambos grupos forman un mismo subconjunto lo cual indica que sus efectos son comparables pero inferiores a Cicatricure.

Finalmente, el día 28 cada uno de los subconjuntos homogéneos está formado por un único tratamiento, el de mayor efecto es el grupo tratado con Cicatricure seguido del extracto al 1,0% y en tercer lugar el extracto al 0,5% de concentración.

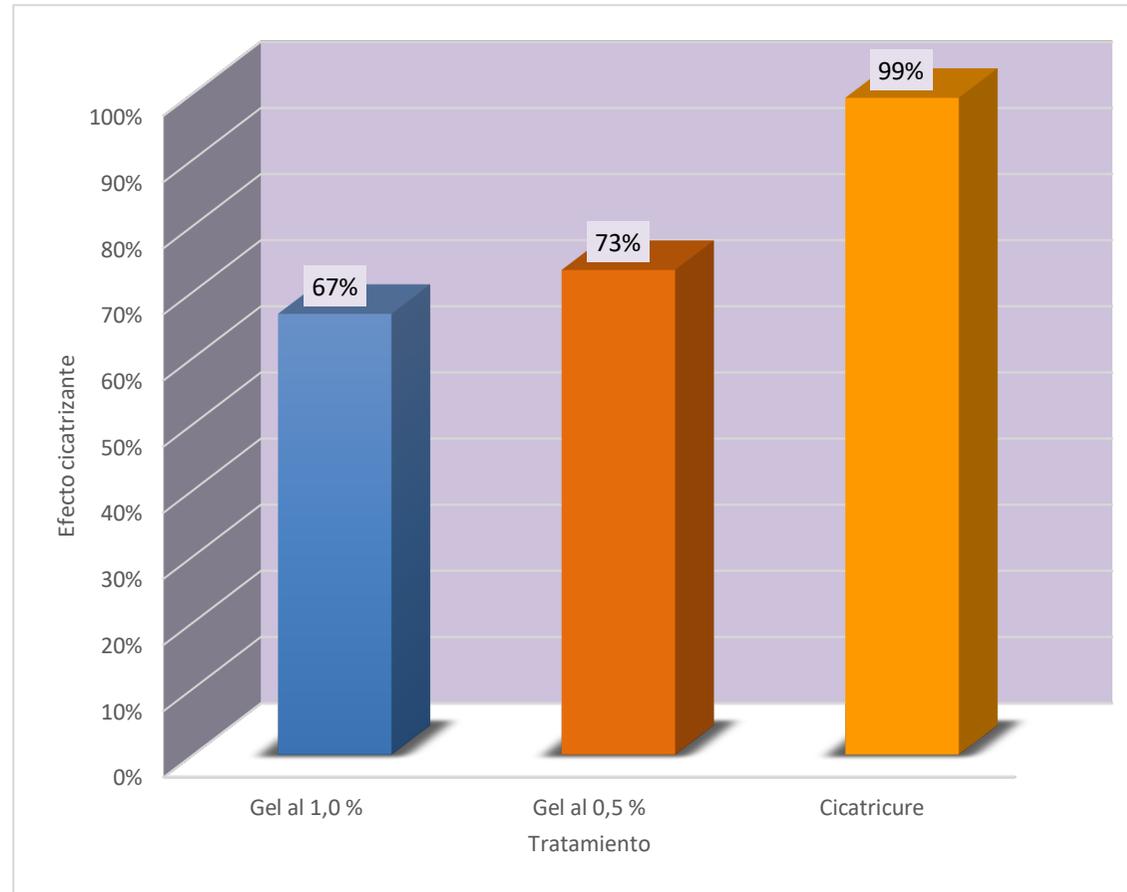


Figura 18. Actividad cicatrizante del Gel elaborado con el extracto hidroalcohólico hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”.

Interpretación: La figura indica que al aumentar la concentración del gel de 0,5 a 1;0% hay un aumento en el efecto cicatrizante de 66,8 a 73,8%.

IV.DISCUSIÓN

4.1. Discusiones

En la presente investigación se demostró cualitativamente el perfil de seguridad de irritación dérmica in vitro y la actividad cicatrizante de las formulaciones magistrales (geles) elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”.

Con respecto a la prueba de solubilidad (ver tabla 4) demuestra que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”, coincide con la investigación de Huari E. y De La Cruz L. titulado Efecto terapéutico del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”, en forma de crema farmacéutica; diferenciados por la solubilidad del agua en donde indica que es menos soluble.

De acuerdo al análisis de cualitativo y fitoquímico (ver tabla 5) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”, contiene carbohidratos (metabolito primario) y compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, naftaquinonas, antraquinonas y antronas (metabolitos secundarios) coincidiendo con la investigación de Huari E y De La Cruz L. que a su vez encontró saponinas. Para nuestra investigación se ha elegido utilizar etanol para la obtención del extracto, por presentar mejor miscibilidad con el agua en todas sus proporciones y al no presentar toxicidad se acepta para uso en la elaboración de productos de uso tópico, también presenta una ventaja de rápida evaporación, y menor tiempo de secado, accesible y de bajo costo.

Los geles proporcionan un entorno húmedo necesario para la cicatrización, recuperan el aspecto y naturaleza de la piel, son bien tolerados produciendo frescor y fácilmente lavables; es por ello que se utilizó como vehículo principal en la fórmula magistral de la

presente investigación. En la elaboración del gel no se utilizó conservantes microbianos como parte de su formulación debido a la acción antimicrobiana de la *Oenothera rosea* Ait.

En relación con el perfil de seguridad los geles elaborados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”, a concentraciones del 0,5% y 1% presentan un valor promedio de 2,66 y 4,38 (ver tabla 13 y figura 9) en el rango HET CAM y clasificándose en la categoría de irritantes leves según la clasificación del índice de irritabilidad (ver tabla 3). Para la determinación de las concentraciones 0,5% y 1% de los geles nos basamos en los resultados de los extractos al 0,5%, 1%, 2% y 5%; los cuales refieren como irritabilidad leve los extractos a concentraciones de 0,5%, 1 %, sin embargo, los extractos al 2 % y 5 % presentan una irritabilidad muy alta tal como se muestra en la (ver tabla 11) coincidiendo con Rivera M. en su investigación constituyendo una relación directa a mayor concentración mayor efecto irritante aunque difiera de la especie, asimismo coincide con la presencia de metabolitos.

En relación con la actividad cicatrizante, la evolución de la cicatrización con el mismo tiempo de tratamiento se observó que los grupos tratados con los geles a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”, a concentraciones de 0,5% presento un porcentaje de cicatrización de 67%, mientras que los grupos tratados con el gel al 1% presento 73%; al comparar los dos geles contra el Cicatricure (grupo control) se obtuvo mayor efecto cicatrizante con un 99% (ver figura 19). Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación podemos afirmar que el gel a base de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”, al 0,5% y 1% de concentración presenta actividad cicatrizante en heridas abiertas debido a la presencia de taninos (ver tabla 5) los responsables de la actividad cicatrizante, debido a su capacidad astringente logran mover la piel para mover las capas de la

piel, lo que permite la renovación de los tejidos dañados, también tienen influencia de vasoconstrictor para los vasos sanguíneos. Detener el sangrado, reducir la pérdida de fluidos fisiológicos mejorará la reposición de tejidos en herida de superficie, las costras formadas se unen a los taninos formando un medio seco que impide el desarrollo de microorganismos teniendo coincidencia con Sotomayor I y Tamara J. en su investigación Efecto cicatrizante de la solución acuosa de *Oenothera rosea* posterior a una incisión lineal vertical en cobayos.

4.2. CONCLUSIONES

- Se verificó la presencia de un metabolito primario: carbohidrato y diferentes metabolitos secundarios como: compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides Naftaquinonas, antraquinonas y antronas.
- Se elaboró los geles (fórmulas magistrales) a concentraciones de 0.5% y 1 % con el extracto Hidroalcohólico de hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre".
- Se comprobó el perfil de seguridad de los geles de extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" a concentraciones 0,5% y 1% presentando el valor promedio de 2,66 y 4,38 en el rango HET CAM y clasificándose en la categoría de irritantes leves el cual indica que de tener algún contacto con el ojo no presentara complicaciones o reacciones desfavorables.
- Se comprobó la actividad cicatrizante de los geles de extracto seco de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. "Chupa sangre" a concentraciones de 0,5% y 1% presentando un porcentaje de cicatrización de 67% y 73% en comparación de Cicatricure quien muestra mayor porcentaje de cicatrización.

4.3. RECOMENDACIONES

- Promover de nuevos métodos científicos como el método alternativo HET CAM entre otros para evitar y disminuir la manipulación de animales en los trabajos de investigación a quienes se le causa daños irreversibles que los llevan al sacrificio.
- Continuar con los estudios de irritabilidad con sustancias activas y extractos que se vienen utilizando en diversidad de productos generalmente cosméticos y productos de administración tópica.
- Realizar estudios clínicos del efecto cicatrizante de los geles de extracto hidroalcohólico con la finalidad de contribuir con el desarrollo de la especie en la industria farmacéutica y cosmética.
- Evaluar la actividad cicatrizante de la *Oenothera rosea Ait.*, con nuevos modelos experimentales que permitan el desarrollo de otras formar farmacéuticas.
- Realizar estudios de estabilidad acelerada y estabilidad a tiempo real de gel a base de extracto de hojas de *Oenothera rosea Ait.* “Chupa sangre”, para poder demostrar si se mantienen los atributos de calidad y establecer el tiempo de vida útil del producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez M. Alternativas a la experimentación en animales en toxicología: Situación actual. Rev. Española Acta Bioética. 2007; 13 (1):41-52
<http://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100005>
2. Vaquero C. Manual de Experimentación Animal. Valladolid: Universidad de Valladolid; 1993. 200 p. 1ª edición.
<http://iberlibro.com> - ISBN: 9788477623830
3. Wallace A. Principles and methods of toxicology. Boca Raton: Taylor y Francos Group. 2007.
<https://doi.org/10.1201/b14258>
4. Wagner D. Plaquetas en la inflamación y trombosis. Rev. Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.2003; 23 (2): 2131-2137.
<doi/full/10.1161/01.atv.0000095974.95122.ec>
5. Huari E, De la Cruz L A.Efecto terapeutico del extracto etanolico de las hojas de oenothera rosea Ait "chupa sangre", en forma de crema Farmaceutica. Lima- Peru [Tesis de grado] Facultad de Farmacia y Bioquimica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos .2017.disponible en:
http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877266/efecto-terapeutico-del-extracto-etanolico-de-las-hojas-de-oenot_sgljlsIC.pdf.
6. Villena C , Arroyo J. Efecto antiinflamatorio del extrato hidroalcoholico de oenothera rosea "Yawar socco" en ratas con induccion a la inflamcion aguda y cronica .Rev.Peru ciencia e investigacion de la universidad nacional mayor de san marcos .2012,15(1)15-9
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3178>
7. Robak J;Gryglewski R. Bioactivity of flavonoids .Rev.Polish journal of Pharmacology 1996;48(6) 555-64.
<https://europepmc.org/article/med/9112694>

8. Huaman J. Kasay M. Estudio cuantitativo de taninos de oenothera rosea L Her. Ex Aiton .Rev. Peruana de Quimica e Ingenieria Quimica .2013; 16(3): <https://docplayer.es/76507067-Estudio-cualitativo-y-cuantitativo-de-taninos-de-la-oenothera-rosea-l-her-ex-alto-n.html>
9. Brunenton, J.Farmacognosia, plantas medicinales 2da edicion, Zaragoza: ascribia SA; 2001.
10. Rivera M. Actividad irritante ocular in vitro por el metodo HET-CAM del extracto etanolico de la raiz, tallo y hojas de remux crispus L. (cuturumasa) [Tesis de grado] Lima: Facultad de ciencias Farmaceuticas y bioquimicas. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. 2017. Disponible en <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2039>
11. Estrada S. Enfermeria en curacion de heridas. Buenos Aires: Ediciones Medicas Del Sur 2012. <https://www.roemmers.com.ar/sites/default/files/Cuidados%20de%20Enfermeria%20en%20las%20Heridas.pdf>
12. Patiño F, Herrera N, Baptista S. Heridas y sales de cirugía hospitalarias .Manuel de procedimientos. Bogata: Fundación santa Fe de Bogotá; (2015) pag. 4: 23-32.
13. Enciclopedia de clasificaciones .[Internet].2016 tipos de herida .[citado el 30 de abril 2018] Disponible en <http://www.tiposde.org/salud/83-tipos-de-heridas>
14. Bello N, Valdés C , conde León SV. Anatomia y fisiología de la piel .Rev peruana de dermatología 2001;11(2) disponible en <https://enferlic.blogspot.com/2013/12/anatomia-y-fisiologia-de-la-piel.html>
15. Gallardo G, Barboza L Efecto cicatrizante del gel elaborado del látex de crotonlechleri “ Sangre de Drago “ Rev científica de ciencias Médicas Cochabamba 2015-18 (1) <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sc>

16. Valandía A. Evaluación de la Actividad cicatrizante y caracterización fitoquímica de *Dracontium cratii*. [Tesis de Maestría] bogota : Facultad de Ciencias Departamento de Farmacia . Universal Nacional de Colombia. bogota D.C, 2009. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8469/1/192529.2009.pdf>
17. Proaño J Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de romero (*Rosmarinus officinalis*), MATICO (*piperaduncum*) y cola de cabello (*Equisetum Arvense*) en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*). [Tesis para bachiller] Riobamba. Escuela superior politécnica de Chimborazo Facultad de ciencias escuela de boquímica y farmacia, Ribamba –ecuador , 2013. disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2611/1/56T>
18. Díaz L. Evaluación de la permeación y la irritación ocular y dérmica de una mezcla de ramnolipidos a través de metodologías in vitro. [Tesis Magister] Bogota. Facultad de ciencias, Departamento de Farmacia. Bogota .Universidad nacional de Colombia .2019. disponible en : <http://bdigital.unal.edu.co/73442/2/1071329864.2019.pdf>
19. Guaita M. Derminacion de las actividades foto protectora, genotoxica y de irritación ocular in vitro del extracto hidroalcoholico de *lippia scorodonioides* escuela superior politécnica de Chimborazo , facultad de ciencias , farmacia y bioquímica , Riobamba ecuador , 2018. Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/8890>
20. Fernández A; Gonzales M; Gil M, Santiago M, blanco J, Piñeiro P, et al .Evaluación de toxicidad ocular in vitro de los colirios fortificados elaborados en los servicios de Farmacia Hospitalaria .Rev Farmacia Hospitalaria .2016.40 (5) <http://dx.doi.org/10.7399/fh.2016.40.5.10416>.
21. Celestino F, Llacsá L; Evaluación de la irritabilidad ocular in vitro mediante el método HET- CAM en crema para contorno de ojos con o sin registro sanitario que se comercializan en el distrito de la victoria , la parada –Lima.

- Perú [tesis de grado] Facultad de Farmacia Y Bioquímica. universidad norbert winer .2018. disponible en.
<http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/1736>.
22. Quiroz R ; Moreno G. Evaluación de irritabilidad por el método HET-CAM del gel elaborado con extracto hidroalcohólico de las hojas de *Phytolacca grossus* (calaguala) [tesis de grado] Lima Facultad de ciencias Farmacéuticas Y Bioquímica. Universidad Inca Garcilaso De La Vega .2018 disponible en. <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/3702>
23. Rivera M. Actividad irritante ocular in vitro por el método HET- CAM del extracto etanólico de la raíz, tallo y hojas de *Remum Crispus L.* (Cuturumasa) [Tesis de grado] Lima: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. 2017. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2039>
24. Mayta E. Estandarización y validación del método in vitro HRT-CAM para determinar la irritabilidad oftálmica de champús para bebés. [tesis de grado]. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2018. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/9576>.
25. Ramos C, Villegas B (2015) "Determinación de la actividad cicatrizante de las sumidades floridas de *Oenothera rosea* (yawar chonca) en extracto y gel aplicados sobre heridas experimentales en *Rattus norvegicus*, (tesis para grado) Arequipa 2015, facultad de ciencias farmacéuticas, bioquímicas y biotecnológicas, Disponible en <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3447/65.1528.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
26. Celestino K, López J. Efecto cicatrizante de un gel a base del extracto etanólico de las hojas de ortiga (*Urticaria urens L.*) y extracto etanólico del mucilago de la sábila (*Aloe vera (L)*) en ratas albinas [tesis de grado] universidad inca Garcilaso de la vega 2018 disponible en

<http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2166/Tesis%20CELESTINO%20MALLQUI-%20LOPEZ%20PARRA.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

27. Mogrovejo C. Determinación del efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Calendula officinalis* L. (*Calendula*) en animales de experimentación. [Tesis de grado]. Universidad De Santa Maria. Arequipa 2014. Disponible. <http://tesisucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/4409>
28. Pineda N. Cervantes G. Vílchez H, Villanueva, Pulido V. Efecto irritante in vitro del gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (cactaceae) "Pitahaya" por el método HET-CAM. Rev. Peru. Arnaldoa 2019 26 (2). 369-389.
29. Ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Departamento de Ciencias, 2016. [Http://www.worldcat.org/wcidentities/lccn-n99013875](http://www.worldcat.org/wcidentities/lccn-n99013875)
30. Taype E. Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro [Tesis de grado]. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2015. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4474/Taype>
31. 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 1991 5(5:6):539-542 disponible en [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(91\)90089-V](https://doi.org/10.1016/0887-2333(91)90089-V)
32. Yarleque M. Aislamiento y caracterización bioquímica de compuestos fenólicos con actividad anticoagulante del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea Aiton* Chupasangre. Lima Perú [Tesis de grado] Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2016. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4990>.

33. Domínguez A. Métodos de Investigación Fitoquímica. México DF: Limusa; 1979.
<https://es.scribd.com/document/120712585/metodos-de-investigacion-fitoquimica>
34. Luepke N . Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. Rev. Food Chem Toxicol. 1985 23 (2): 287–291.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4)
35. Remington Genaro A. Farmacia, Tomo I 19 ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana; 2003. <https://es.scribd.com/doc/161266443/>
36. Sagazata J Jampi K: la medicina está en nuestras manos. Proyecto de Salud Tiraque. 1996.
https://books.google.com.pe/books/about/Jampi_makikunanchiqpi_kasan.

ANEXOS

ANEXO A: Operacionalización de variables

VARIABLE,	DEFINICION CON9CEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA	INTRUMENTO	FUENTE
INDEPENDIENTE			Taxonomía de la planta	Morfología de las hojas	SI/NO	Certificado de especie botánica	Museo de historia natural UNMSM
Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. "Chupa sangre"	Sustancia obtenida por extracción de una parte de una planta, a menudo usando un solvente como etanol o agua	Producto obtenido de la extracción hidroalcohólico de las hojas de <i>Oenothera rosea</i> Ait. "Chupa sangre"	Idoneidad del extracto	Grado de solubilidad	Muy soluble (+++) Poco soluble (++) Débilmente soluble (+) Insoluble (0)	Formato de resultados	Lock, O. Investigación Fitoquímica. 2 da Ed. Lima Domínguez A. Métodos de Investigación Fitoquímica
			Identificación de compuestos químicos	Carbohidratos	*/-		
				Flavonoides	*/-		
				Cumarinas	*/-		
				Quinonas	*/-		
				Alcaloides	*/-		
				Aminoácidos libres y grupos amino	*/-		
				Esteroides	*/-		
				Triterpenoides y	*/-		
				Saponinas	*/-		
				Glucósidos	*/-		
Compuestos fenólicos	*/-						

				Taninos	*/-		
				Naftaquinonas, antraquinonas y antronas	*/-		
				0,5% 1% 2% 5%	Con efecto Sin efecto		
			Concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de la <i>Oenothera rosea</i> Ait.	Hemorragia Lisis Coagulación.	No irritante Irritante leve Irritante moderado Irritante severo	Cuantitativa	
DEPENDIENTE	Reacción localizada de la piel resultante de una exposición única o múltiple a un agente físico o químico sobre la misma zona. Se caracteriza por el enrojecimiento y la inflamación y puede llegar a necrosis localizada.	Análisis de las condiciones que pueden llegar provocar un potencial daño a las personas cuando son sometidas a la acción de un agente extraño o noxa.	Índice de irritabilidad (I.I).	Hemorragia Lisis Coagulación. Disminución del tamaño de la herida	No irritante Irritante leve Irritante moderado Irritante severo Cicatrizante No cicatrizante	Ficha Ad hoc para el índice de irritabilidad (I.I)	Het Cam (test de irritación ocular) - LIM S.A. Laboratorios Limsa
Perfil de seguridad de irritación dérmica in vitro y actividad cicatrizante.	La cicatrización de heridas es un proceso fisiológico que tiene como finalidad la reparación del tejido dañado para llevarlo a condiciones normales.	El procedimiento por medio de incisión para evidencia de la cicatrización.	Proceso de Cicatrización	Disminución del diámetro de la herida.	Cicatrizante No Cicatrizante	Ficha Ad hoc medición del tamaño de herida	Actividad cicatrizante con el modelo de heridas incisas.

ANEXO B: Instrumentos de recolección de datos

NÚMERO DE FICHA:		NÚMERO DE RATA		 Universidad Norbert Wiener	
FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LOS ANIMALES (RATAS)					
EVALUACIÓN DEL PERFIL DE SEGURIDAD DE IRRITACIÓN DÉRMICA IN VITRO MEDIANTE EL MÉTODO HET CAM. Y ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE FORMULACIONES MAGISTRALES ELABORADAS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE CHUPA SANGRE (<i>Oenothera Rosea</i> Ait.)					
A) DATOS GENERALES EDAD: SEXO: PESO: RAZA: COLOR:					
B) DATOS ESPECÍFICOS TRATAMIENTO EVALUADO CONTROL NEGATIVO () CONTROL POSITIVO () GEL AL 0,5 % () GEL AL 1,0 % ()					
MOMENTO DE LA EVALUACIÓN (CIERRE DE LA HERIDA)					
	00 DÍAS	07 DÍAS	14 DÍAS	21 DÍAS	28 DÍAS
TAMAÑO DE HERIDA					

INSTRUCCIONES: Para realizar la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático. Si se siente cansado, estresado o enfermo no debería realizar dicha observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad. En el caso de no tener la seguridad sobre la medición de alguna unidad de análisis, descartar su evaluación. Registrar los datos sin borrones ni enmendaduras ni manchas. Tachar los espacios donde no necesita rellenar los datos con una línea.

Fuente: Celestino K., López J.

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS HET CAM CUALITATIVO.			 Universidad Norbert Wiener		
EVALUACIÓN HET CAM:					
Muestras de soluciones control.....()					
Muestras de extracto hidroalcohólico por concentración..... ()					
Muestras de fórmulas magistrales por concentración..... ()					
EVALUACIÓN DEL PERFIL DE SEGURIDAD DE IRRITACIÓN DERMICA IN VITRO MEDIANTE EL METODO HET CAM. Y ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE FORMULACIONES MAGISTRALES ELABORADAS CON EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE CHUPA SANGRE (<i>Oenothera rosea</i> Ait.)					
Muestra	Tipo de control	Nº de huevo	Tiempo de reacción (Segundos)		
			H	L	C
		1			
		2			
		3			
		1			
		2			
		3			
		1			
		2			
		3			
		1			
		2			
		3			

ANEXO C: Consentimiento informado y/o Asentimiento informado

No aplica.

ANEXO D: Acta o dictamen de informe de comité de ética

ANEXO E: Evidencias de trabajo de campo

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO MUSEO DE HISTORIA NATURAL</p>	
<p>"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"</p>		
<p>CONSTANCIA N° 165-USM-2018</p>		
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (planta completa) recibida de Lizeth Manyari Perez y Ronal Suárez Becerra estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad NORBERT WIENER; ha sido estudiada y clasificada como: <i>Oenothera rosea</i> Ait.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):</p>		
<p>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA CLASE: MAGNOLIOPSIDA SUB CLASE: ROSIDAE ORDEN: MYRTALES FAMILIA: ONAGRACEAE GENERO: <i>Oenothera</i> ESPECIE: <i>Oenothera rosea</i> Ait.</p>		
<p>Nombre vulgar: "Chupa sangre". Determinado por: Mag. Asunción A. Cano Echevarría</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.</p>		
<p>Lima, 07 de mayo de 2018</p>		
	 <p>Mag. Asunción A. Cano Echevarría JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>	
<p>ACE/ddb</p>		
<p>An. Arevalos 1256, Jesús María Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú</p>	<p>Teléfono: 619-7000 anexos 5701, 5703, 5704</p>	<p>E-mail: asucano@unmsm.edu.pe http://museohistoria.unmsm.edu.pe</p>

Figura 19. Estudio taxonómico realizado en el museo de historia natural de la Universidad Mayor de San Marcos.



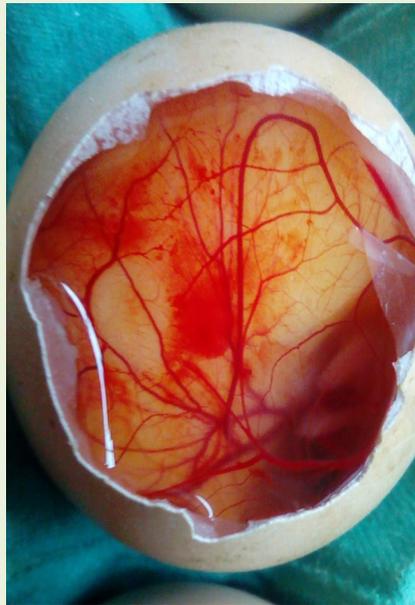
Figura 20. Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait. “Chupa sangre”.



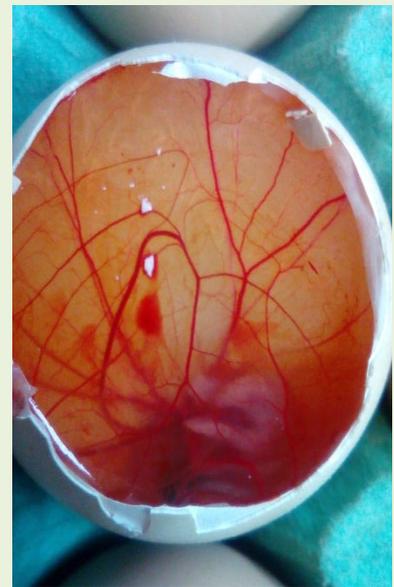
Figura 21. Elaboración de los gels al 0, 5 % y al 1 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* Ait.” Chupa sangre”.



Hemorragia



Lisis



Coagulación

Figura 22. Procedimiento para el perfil de seguridad por HET CAM.

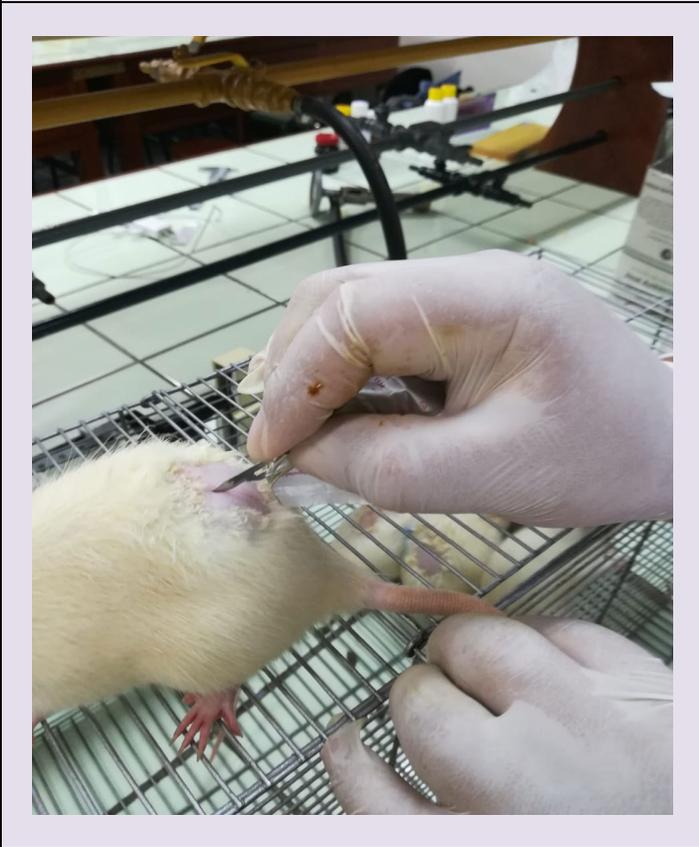
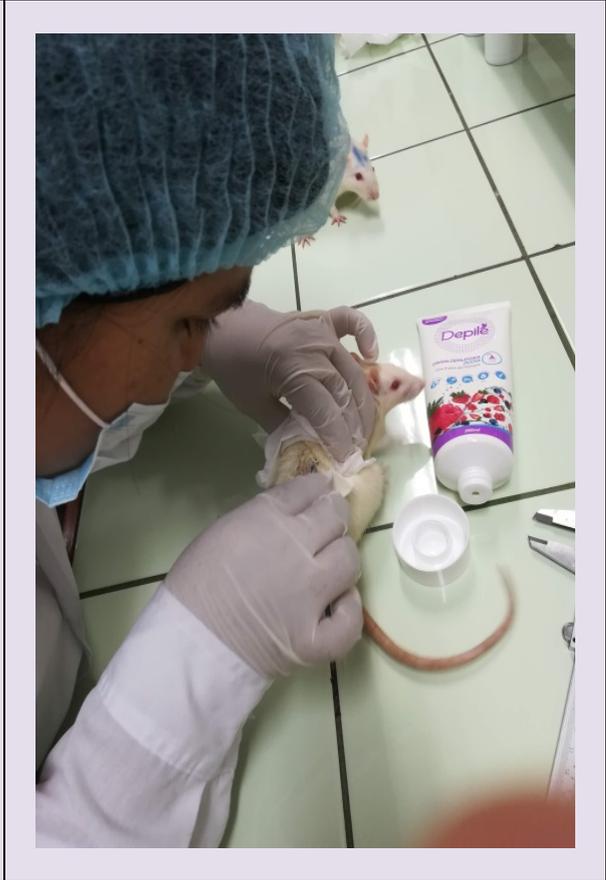


Figura 23. Procedimiento para actividad cicatrizante por el método de herida incisas.