

Evaluación de la actividad biológica del aceite de semillas de *Moringa oleifera*

Evaluation of the biological activity of *Moringa oleifera* seed oil

Vivian Lago Abascal¹ <https://orcid.org/0000-0002-3229-1872>

Gretter León Sánchez¹ <https://orcid.org/0000-0002-3577-6090>

Efraín Rodríguez Jiménez^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8315-4413>

¹Centro de Investigaciones en Plantas Proteicas y Productos Bionaturales, Laboratorio de Investigaciones. La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: efrainrodriguez@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La especie *Moringa oleifera* posee propiedades nutritivas y farmacológicas, y podría convertirse en una alternativa nutricional y preventiva de enfermedades. El aceite es antioxidante, antiinflamatorio y cicatrizante, por lo que el estudio para uso y consumo garantiza su calidad e inocuidad.

Objetivo: Evaluar la actividad biológica del aceite de semillas de moringa para uso seguro y eficaz en el ser humano.

Métodos: Se emplearon semillas de *Moringa oleifera* provenientes de la India. Los animales utilizados fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, Cuba. La alimentación consistió en dieta estándar; para ratas CMO 1004 y para conejos CMO 1400 granuladas (AlyCo[®]) y agua clorada para consumo *ad libitum*.

Resultados: Los ensayos de toxicidad aguda en ratas Wistar, a dosis de 2000 mg/kg no presentaron toxicidad; el aceite se ajustó en la categoría 5 del GHS. La irritación dérmica e irritación ocular en conejos albinos fueron no irritantes. La actividad genotóxica del aceite mediante el test de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón no provocó toxicidad ni daños aneugénico, ni clastogénico sobre el tejido eritropoyético. La actividad cicatrizante

en la epidermis y la dermis de ratón fue similar al Hebermin. Sin embargo, no manifestó efecto dermorregenerador en piel dañada por radiaciones UVB.

Conclusiones: El aceite de semillas de moringa no produce toxicidad aguda oral en ratas, ni provoca daños clastogénico-aneugénico *in vivo*. Se considera seguro a las dosis estudiadas y puede ser una alternativa para el tratamiento de cicatrización de heridas sin efecto dermorregenerador. Es antiinflamatorio y evita la proliferación de microorganismos.

Palabras clave: *Moringa oleifera*; toxicidad aguda; actividad genotóxica.

ABSTRACT

Introduction: *Moringa oleifera* has nutritional and pharmacological properties, which could become a nutritional and preventive alternative for diseases. The oil is antioxidant, anti-inflammatory and healing, so the study for use and consumption guarantee its quality and safety.

Objective: To evaluate the biological activity of Moringa seed oil for safe and effective use in humans.

Methods: The plant species used in this work were *Moringa oleifera* seeds from India. The animals used were supplied by the National Center for the Production of Laboratory Animals (CENPALAB), Havana, Cuba. The diet consisted of a standard diet; for rats CMO 1004 and for rabbits CMO 1400 granules (AlyCo®) (CENPALAB) and chlorinated water for ad libitum consumption.

Results: The acute toxicity tests in Wistar rats, at a dose of 2000 mg/kg did not present toxicity, adjusting the oil to category 5 of the GHS. Skin irritation and eye irritation in albino rabbits were non-irritating. The genotoxic activity of the oil by the micronucleus induction test in mouse bone marrow did not cause toxicity or aneugenic or clastogenic damage on erythropoietic tissue. The healing activity in the mouse epidermis and dermis was similar to Hebermin, however, it did not show a dermoregenerative effect on skin damaged by UVB radiation.

Conclusions: Moringa seed oil does not produce acute oral toxicity in rats, nor does it cause clastogenic - aneugenic damage *in vivo*. It is considered safe at the doses studied and may be an alternative for wound healing treatment without a dermoregenerative effect. It is anti-inflammatory and prevents the proliferation of microorganisms.

Keywords: *Moringa oleifera*, acute toxicity, genotoxic activity

Recibido: 18/01/2023

Aceptado: 01/03/2023

Introducción

Moringa oleifera pertenece al género *Moringa* y consta de 13 especies. Es nativa del sur del Himalaya.⁽¹⁾ Actualmente, se encuentra en el Oriente Medio, en países africanos y asiáticos, y por su gran poder de adaptación existe en zonas tropicales y subtropicales afectadas por las sequías.⁽²⁾

Las plantas han servido como recurso natural para prevenir enfermedades y como terapia nutricional. Presentan la ventaja de producir menos efectos adversos que la farmacoterapia clásica, lo que ha conducido a que las investigaciones se centren en descubrir su composición natural en busca de nuevos principios activos.

En regiones de Asia y África las semillas y hojas se usan para la alimentación, la prevención de la ceguera, como purificador de agua y mieles, en la multiplicación de la producción de cultivos tradicionales por medio del extracto de sus hojas y tallos (contiene zeatina y hormona del crecimiento). También se usa en la producción de bioetanol y de aceite comestible.⁽³⁾

Se plantea que el aceite de semilla de moringa no presenta toxicidad aguda en ratas.^(4,5,6) Sin embargo, en el estudio de *Chivapat* y otros⁽⁷⁾ se mostró toxicidad aguda y letalidad cuando se administró extracto etanólico de semillas en ratones. *AlAnizi* y otros⁽⁸⁾ informó citotoxicidad y genotoxicidad del extracto hidrofóbico de semillas y le atribuyó la toxicidad a los alcaloides, las enzimas y los glicosinolatos. No obstante, la concentración de compuestos tóxicos en las semillas de moringa depende de la región geográfica y las condiciones climáticas en las que se desarrollan las plantas.⁽⁹⁾

El aceite obtenido del prensado en frío de semillas de moringa permite extraer vitaminas B y C, grasas monoinsaturadas, ácido oleico y behénico. El contenido de ácidos grasos monoinsaturados es elevado y representa el 76 %. El ácido graso predominante es oleico, además, contiene ácido gadoleico y palmitoleico en cantidades moderadas y esteárico.⁽²⁾ La concentración de este ácido varía según método de extracción, metodología, tipo de solvente y del tratamiento con agua caliente o el uso de enzimas específicas.

El aceite contiene antioxidantes que protege contra daños causados por los radicales libres y enfermedades degenerativas. Contiene agentes antiinflamatorios que ayudan a reducir la

inflamación y el dolor, lo que es útil para el tratamiento de picaduras, quemaduras, erupciones⁽¹⁰⁾ y en la cicatrización,⁽¹¹⁾ en el cual están implicado una serie de procesos celulares y bioquímicos.⁽¹²⁾ Se utiliza en terapias antioxidantes para disminuir la genotoxicidad del arsénico y otros metales pesados, cuyos mecanismos de acción carcinogénica están relacionados con especies reactivas de oxígeno.⁽⁶⁾ Las interrelaciones entre estos tipos celulares están reguladas por las citocinas, la matriz extracelular y las metaloproteinasas.⁽¹³⁾

El factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, EGF) es importante en la curación de heridas y quemaduras, Regula la inflamación y la acción de los fibroblastos y estimula el crecimiento de las células epiteliales para la reparación del tejido.⁽¹⁴⁾

Las industrias de cosméticos y las farmacéuticas incluyen el aceite de semillas de moringa en la formulación de leches y tónicos limpiadores con acción purificante o desintoxicante, y como adyuvante de principios activos, como emoliente y saborizante. Su consumo se ha incrementado en las exportaciones hacia Europa como lubricantes de maquinaria.^(15,16,17)

Por lo antes expuesto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad biológica del aceite de semillas de moringa para uso seguro y eficaz en el ser humano.

Métodos

Muestras para los ensayos

La especie vegetal utilizada en este trabajo fue la *Moringa oleifera* (semillas), proveniente de la India. El aceite se obtuvo mediante el prensado en frío de las semillas descascaradas, con una prensa hidráulica en las instalaciones del Proyecto “Moringa como suplemento nutricional”; del Centro de Investigaciones en plantas Proteicas y Productos Bionaturales (CIPB), La Habana, Cuba. Se conservó a temperatura ambiente en frascos protegidos de la luz.

Animales de laboratorio

Los animales utilizados fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. La alimentación consistió en dieta estándar para ratas CMO 1004, y para conejos CMO 1400 granuladas (AlyCo®) (CENPALAB) y agua clorada para consumo *ad libitum*.

Los estudios con animales se realizaron en el Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), La Habana, Cuba, y fueron financiados por un proyecto de Fondos para Ciencia e Innovación (FONCI), del Ministerio de Ciencias, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), Cuba.

En la toxicidad aguda oral se emplearon ratas Wistar, hembras, nulíparas, de peso corporal entre 150 y 200 g. En el potencial irritante dérmico y ocular fueron conejos albinos, machos de 1,5 a 2,0 kg de peso corporal. Para el potencial genotóxico se emplearon ratones neonatos machos, entre 5 y 12 semanas de edad con un peso corporal entre 20 y 30 g. El test de inducción de micronúcleos (MN) en médula ósea *in vivo* se empleó ratones neonatos machos (RNM).

En la actividad genotóxica se empleó el Sistema de Ensayo de Reversión Bacteriana en *Salmonella typhimurium* (*Salmonella*/Microsoma). Se emplearon cepas TA 98 y TA 100, del Dpto. de Bioquímica de la Universidad Autónoma de México. Una vez recibidas se analizaron sus genotipos y fueron conservadas a -80 °C.⁽¹⁸⁾

Se trataron ratas Wistar de 200 g de peso con fenobarbital y benzonaftoflavona para preparar la fracción microsomal de hígado de rata (S9), según Maron⁽¹⁸⁾ y Mortelmans.⁽¹⁹⁾ La fracción microsomal S9 se almacenó en porciones de 1 mL y se conservó a -80 °C.

La mezcla S9 contiene KCl 33 mM, MgCl₂ 8 mM, NADP 4 mM, Glucosa 6-fosfato 5 mM, 4 % (V/V) de fracción S9 y tampón-fosfato de sodio 200 mM, pH 7,4 se preparó en el momento del ensayo y se mantuvo en baño de hielo hasta su uso.

Para la determinación de la actividad cicatrizante se emplearon ratas Wistar, machos, de peso corporal entre 200 y 250 g.

En el estudio del efecto dermorregenerador se utilizaron ratones Balb/C, machos, de 20 a 25 g de peso corporal.

Todos los animales en estudio permanecieron siete días en cuarentena antes de comenzar el ensayo para su adaptación a las condiciones de laboratorio, en sala aclimatada con temperatura controlada de 22 ± 2 °C y ciclo luz-oscuridad 12/12 h.

Diseño experimental

Toxicidad aguda oral

La toxicidad aguda oral se conformó por tres grupos, con tres animales cada uno, distribuidos al azar y un grupo control sin tratamiento. Las ratas ayunaron 16 h antes de la administración por vía oral según OECD,⁽²⁰⁾ mediante cánula intragástrica a la dosis de 20

mL/kg (máximo volumen permisible para la especie), en dos tomas separadas. El ensayo se repitió con tres animales más, a la misma dosis, ya que no se observó mortalidad.

Los animales fueron observados durante 24 h y durante 14 días. Se registraron los síntomas tóxicos.

Concluido el ensayo se sacrificaron los animales con sobredosis de tiopental para realizarles la autopsia. Se efectuó el examen macroscópico de órganos y tejidos (corazón, riñón, pulmón, estómago, hígado, bazo, timo e intestino). Ante cualquier alteración macroscópica detectada en órganos y tejidos se procedió a la toma de muestra para realizar el análisis histopatológico.

El peso corporal se registró al inicio, a los siete días y al final del experimento. El grupo control recibió solamente agua.

Ensayo de irritación dérmica

El ensayo se realizó según OECD.⁽²¹⁾ El día antes del ensayo los animales fueron rasurados en el área dorsal del lomo, a una distancia suficiente de la columna vertebral para proceder a la observación de los sitios de ensayo.

Se seleccionaron tres conejos con la piel intacta (tres sitios por producto) a los que se les aplicó 0,5 ml de la sustancia sobre la piel durante 4 h. Se cubrió el sitio de aplicación con parche de gasa de 2,5 x 2,5 cm, adheridos a la piel con cinta hipoalérgica. Se retiraron los parches al finalizar este período, y una vez marcado el sitio de aplicación se removieron los remanentes de la sustancia de ensayo con agua estéril.

Las observaciones fueron realizadas a las 0,5; 1; 24; 48 y 72 h después de la remoción del parche. Las reacciones sobre la piel para eritema y edema se establecieron con la siguiente evaluación:

- Eritema y formación de escaras. No eritema (0). Eritema muy ligero, escasamente perceptible (1). Eritema bien definido (2). Eritema moderado a severo (3). Eritema severo (4).
- Para la formación de edema. No edema (0). Edema muy ligero, escasamente perceptible (1). Edema ligero, con elevación de 1 mm (2). Edema moderado, con elevación de más de 1 mm (3). Edema severo, con elevación de más de 1 mm y más allá del sitio de aplicación (4).
-

Se determinó el índice de irritación primario (IIP), donde se tuvo en cuenta las observaciones realizadas a las 24, 48 y 72 h después de la aplicación. Se evaluó la categoría en: No irritante (0 - 0,4), Irritante ligero (0,5 - 1,9), Irritante moderado (2,0 - 4,9) e Irritante severo (5,0 - 8,0).

Ensayo de irritación ocular

El ensayo se realizó según OECD.⁽²¹⁾ Se seleccionaron tres conejos que fueron sometidos a examen de córnea, iris y conjuntiva para descartar la presencia de daño. Se utilizó el sistema de evaluación siguiente:

- Lesiones oculares en córnea, opacidad y grado de densidad. Áreas dispersas difusas, iris claramente visible (1). Áreas traslúcidas, fácilmente discernibles, iris ligeramente oscurecido (2). Áreas opalescentes, iris no visible, tamaño de la pupila escasamente discernible (3). Áreas opacas, iris invisible (4). Áreas de la córnea involucrada, áreas de $0 < x \leq 1/4$ (1), $1/4 < x \leq 1/2$ (2), $1/2 < x \leq 3/4$ (3), $3/4 < x \leq 1$ (4).

Para la evaluación se efectúa $(A \times B) \times 5$ (valor máximo posible 80 puntos) para el iris.

- Pliegues sobre lo normal, congestión, inflamación, inyección circuncorneal (uno de ellos, o todos, o cualquier combinación), el iris aún reacciona a la luz (una reacción retardada es positiva) (1).
- No reacciona a la luz, hemorragia, destrucción gruesa (uno o todos estos) (2).

Para la evaluación se efectúa $A \times 5$ (valor máximo posible 10 puntos) para conjuntiva.

A. Enrojecimientos. Vasos definitivos inyectados sobre lo normal (1). Difuso, rojo, carmesí, vasos individuales discernibles (2). Rojo difuso (3).

B. Quemosis. Inflamación sobre lo normal (incluye la membrana nictitante) (1). Inflamación con eversión parcial de los párpados (2). Inflamación con los párpados cerrados hasta la mitad (3). Inflamación con los párpados de la mitad a cerrados (4).

C. Secreciones. Cantidad fuera de lo normal (1). Con humidificación de los párpados (2). con humidificación de los párpados y zonas alrededor de los ojos (3).

Para la evaluación se efectúa $(A + B + C) \times 2$ (valor máximo posible 20 puntos).

El valor total de la prueba fue la suma de los valores individuales de la córnea.

Para el ensayo fue instilado 0,1 ml de la sustancia en el ojo derecho de tres animales y el ojo izquierdo como control. Ambos párpados fueron cerrados 15 seg para garantizar el máximo

contacto de la sustancia de ensayo con las estructuras oculares. Fue examinado a las 1, 24, 48 y 72 h de la aplicación inicial para detectar daños de las estructuras oculares. Las observaciones se realizaron con luz blanca para detectar eritema, edema y secreciones anormales, además de la reacción del iris a la luz, seguido del examen de la córnea por la tinción con fluoresceína y la observación con lámpara UV.

Las reacciones oculares fueron evaluadas de acuerdo con la escala anterior.

Una vez examinado ambos ojos, se determinó el índice de irritación ocular (IIO). La clasificación se realizó según *García*⁽²²⁾ (no irritante $0 \leq x < 10$, ligeramente irritante $10 \leq x < 20$, moderadamente irritante $20 \leq x < 30$ e irritante severo $30 \leq x \leq 110$).

Actividad genotóxica mediante el test de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón

Se realizaron dos administraciones por vía oral cada 24 h y al control positivo solo una vez por vía intraperitoneal. El sacrificio se realizó según *Hayashi*.⁽²³⁾

Ensayo de test de inducción de micronúcleos en médula ósea *in vivo*

El aceite de moringa se administró por vía oral, cada grupo con diferente dosis (10, 100 y 1000 mg/kg de peso corporal), incluido el control negativo y el positivo (ciclofosfamida). Realizadas las dos administraciones, se extrajo los fémures de cada ratón y fueron perfundidos con 1 mL de suero bovino fetal para obtener las células de la cavidad medular. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm, por 10 min. El sobrenadante se desechó y se tomó el precipitado. Se tomó 10 μ L para realizar dos frotis por animal, en portaobjetos. Las láminas se secaron a temperatura ambiente por 24 h, se fijó en metanol 80 % (V/V) y se tiñó con giemsa 5 % (V/V), durante 21 min.^(23,24) La lectura se realizó según *Guideline*.⁽²⁴⁾

Actividad genotóxica mediante el Sistema de Ensayo Reversión Bacteriana en *Salmonella typhimurium* (salmonella/microsoma)

Los cultivos bacterianos se prepararon en 5 mL de caldo nutriente N°.2 OXOID, inoculados a partir de cultivos de cepas madres. Se incubaron a 37 °C con agitación, durante 16 - 18 h. Todos los medios de cultivo se prepararon según *Maron*⁽¹⁸⁾ y *Mortelmans*.⁽¹⁹⁾

Se probaron concentraciones del aceite de moringa (0,1, 1, 10 y 100 μ g/mL) para ambas cepas sin S9, y concentraciones de 50, 500 y 5000 μ g/mL para ambas cepas con S9.

Como control negativo se empleó agua destilada estéril. Como controles positivos se empleó ázida de sodio (1,5 µg/placa) para la cepa TA 100 (sin S9), ácido picrolónico (100 µg/placa) para la cepa TA 98 (sin S9), 2-aminofluoreno (10 µg/placa) para la cepa TA 98 (con S9), y benzo-a-pireno (10 µg/placa) para la cepa TA 100 (con S9), que son mutágenos reconocidos para este ensayo.⁽¹⁸⁾

EL ensayo de Ames se realizó según el método de *Maron*,⁽¹⁸⁾ *Mortelmans*⁽¹⁹⁾ y OECD.⁽²⁵⁾ El resultado positivo se definió como un aumento en el número de revertantes, que superó por más de dos veces la frecuencia de reversión del control negativo (solvente) y mostró un incremento en el número de revertantes en función de la concentración del producto.

Actividad cicatrizante

Las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal (hidrato de cloral 400 mg/kg; 0,007 mL/g). El área dorsal de cada rata fue depilada con crema depilatoria, se desinfectó la piel con solución de etanol 70 % (V/V), y se procedió a inducir las quemaduras a todos los animales con un dispositivo metálico de 1 cm de diámetro, sumergido en agua hirviendo (100 °C). Luego de estabilizada la temperatura del agua durante 5 min se tomó el dispositivo metálico y se colocó durante 20 seg, sin presión sobre la piel del animal, en la zona dorsal para lograr una quemadura de segundo grado.

Cada animal fue distribuido al azar en los grupos de tratamiento: Grupo I - Control (N = 3), Grupo II - tratado con aceite de moringa (N = 4), Grupo III - tratado crema Hebermin (Heber-Biotech, CUBA) (N = 4).

Para el tratamiento con aceite de moringa se administró 0,2 mL y para el de herbermin 0,030 g, durante 14 días, con inspección diaria de las lesiones, y se evaluó según la escala de descriptores:

- Bordes. Bordes confusos (difusos, contornos no claros visibles), definidos (contornos claros visibles, adjuntos, parejos con la base de la herida), bien definidos (no adjuntos a la base de la herida), y bien definidos (fibróticos, macados o hiperqueratosis).
- Tipo de exudado. Ninguno, sanguinolento, serosanguíneo no espeso (acuoso de rojo a rosa pálido), seroso no espeso (acuoso, claro) y purulento espeso o no (opaco, amarillo/bronceado, con o sin color).
- Cantidad de exudado. Ninguno (herida seca), escaso (herida húmeda, pero sin exudados observables), poca, moderada y abundante.

- Color de la piel alrededor de la herida. Rosado o normal de acuerdo al grupo étnico, rojo brillante y/o pálido al tacto, blanco o gris pálido o hipopigmentado, rojo oscuro o púrpura y/o no blanqueable y negro o hiperpigmentado.
- Edema en tejidos periféricos. Sin hinchazón o edema, edema no marcado que se extiende menos de 4 cm alrededor de la herida, edema no marcado que se extiende más de 4 cm alrededor de la herida, edema marcado que se extiende menos de 4 cm alrededor de la herida y edema “crepitus” y/o marcado que se extiende más de 4 cm.
- Endurecimiento del tejido periférico. No presente, endurecimiento menor de 2 cm alrededor de la herida, endurecimiento de 2 a 4 cm que se extiende menos del 50 % alrededor de la herida, endurecimiento de 2 a 4 cm que se extiende más del 50 % alrededor de la herida y endurecimiento mayor de 4 cm en cualquier área alrededor de la herida.

Al finalizar el tratamiento, se sacrificaron los animales y se removió el tejido de las quemaduras para su análisis histopatológico. Como parámetro macroscópico del efecto cicatrizante, se controló a lo largo del estudio la contracción del área de la herida. Se tomaron fotos de cada animal al inicio del tratamiento (nivel basal) y cada tres días posterior a la quemadura. Para el cálculo del área de la quemadura las fotos fueron analizadas en el programa ImageJ, (Rasband, W.S.), U.S *National Institutes of Health*, USA. Los resultados fueron el porcentaje de disminución del área (contracción de la herida), en relación al valor basal.

Las piezas anatómicas fueron procesadas para microscopía óptica y por técnicas histológicas. La interpretación histopatológica y la comparación de la respuesta entre los grupos se realizó según *Berlanga*.⁽²⁶⁾

Evaluación del efecto dermorregenerador

La evaluación del efecto dermorregenerador se realizó según *Regalado*.⁽²⁷⁾ Un día antes del ensayo, los ratones fueron depilados en la zona dorsal con crema depilatoria. Los animales seleccionados con la piel intacta, fueron distribuidos en tres grupos (N = 5): grupo I; control sin tratamiento, grupo II; control radiación sin tratamiento, y grupo III; con tratamiento de aceite de moringa, bajo anestesia con 30 mg/kg de tiopental administrado por vía intraperitoneal. Fueron expuestos a radiación ultravioleta (UVB 312 nm) y se empleó una lámpara UV Spectroline. La radiación se dirigió al área dorsal del animal, a una distancia de

15 cm, durante 30 min. Los tratamientos se aplicaron después de la radiación, con repetición cada 24 h, por 6 días. Cada sustancia se aplicó sobre la piel de la zona dorsal, en una cantidad de 0,1 g, extendida sobre la superficie de la piel.

Se evaluó la apariencia diaria de la piel antes de cada aplicación para detectar la presencia de eritema, escaras y arrugamiento de la piel. Se empleó una escala histopatológica para determinar el grado de dermorregeneración en la piel sensibilizada con UVB de 0 a 3, de acuerdo con el grado de daño observado.

- Grado 0. Sin alteración.
- Grado 1. No necrosis en epidermis, acantosis, anexos viables, matriz intacta y sin reacción inflamatoria.
- Grado 2. No necrosis en epidermis, acantosis, acantolisis, en anexos solo folículos no funcionales, daño discreto de la matriz y reacción inflamatoria discreta.
- Grado 3. Necrosis de la epidermis, acantosis, acantolisis, pérdida de los anexos y reacción inflamatoria intensa con daño de la matriz.

Al finalizar el tratamiento, 24 h después los animales fueron sacrificados por tracción cervical y extraída la piel de la zona dorsal para realizar el análisis histopatológico.

Las muestras de piel fueron procesadas para microscopía óptica, fijadas en formaldehído 10 % e incluidas en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μ m, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y la técnica especial tricrómica de Masson para fibras colágenas.

Procesamiento estadístico

Los ensayos de toxicidad aguda oral, irritación dérmica e irritación ocular y el peso corporal fueron analizados mediante la prueba *t* de *Student*. La evaluación genotóxica fue realizada mediante el test de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. Los grupos fueron comparados en ANOVA y *t* de *Student*. La diferencia se consideró estadísticamente significativa para $p \leq 0,01$. Para la evaluación de la actividad genotóxica mediante el sistema de Ensayo Reversión Bacteriana en *Salmonella typhimurium* (*salmonella*/microsoma). Se aplicó el programa estadístico SALANAL, versión 1.0 de la EPA. Para el proceso estadístico de la actividad cicatrizante se utilizaron los sistemas estadístico EPIDAT 3,2, GraphPad e Instat. En el efecto dermorregenerador se utilizó el programa EPIDAT 4,2.

Resultados

Toxicidad aguda oral

Para la dosis de 2000 mg/kg no se observó sedación o somnolencia. No se presentó mortalidad, ni decremento en el peso corporal. El comportamiento del peso corporal de las ratas en el grupo control los días cero, siete y 14 mostró valores de 173,17 g \pm 5,78, 196,33 g \pm 6,28 y 209,00 g \pm 7,18, respectivamente, con ganancia de peso corporal de 35,83 g \pm 3,31. El grupo tratado mostró, en igual período de tiempo 170,83 g \pm 7,73, 192,83 g \pm 10,53 y 209,33 g \pm 10,73; respectivamente, con ganancia de peso corporal de 38,50 g \pm 4,51. No se observaron signos de toxicidad. La tendencia normal estuvo dirigida a un ligero y similar incremento en el peso corporal de ambos grupos. La figura 1 muestra que no hubo diferencias significativas.

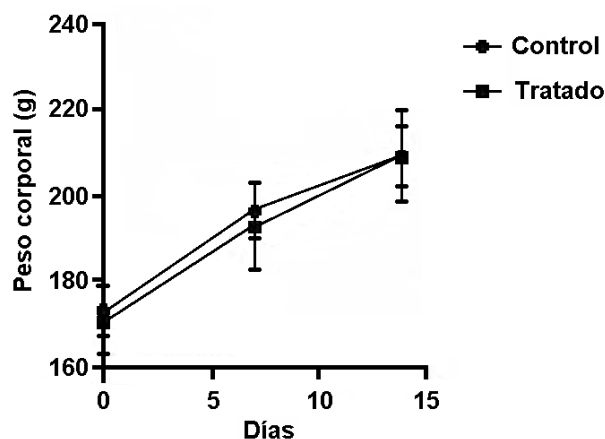


Fig. 1 - Comportamiento del peso corporal en el ensayo de toxicidad aguda $p < 0,05$.

En la necropsia no se encontraron alteraciones patológicas en el análisis macroscópico de los órganos en ninguno de los grupos. Todas las estructuras conservaron la morfología, el tamaño y el peso.

Ensayo de irritación dérmica

No se observaron eritema, ni edema en el sitio de aplicación de los animales tratados con aceite de moringa. El IIP fue igual a 0, lo que clasifica al producto como no irritante.

El incremento del peso corporal fue ligero entre el inicio y final del ensayo, aunque no fue significativo con $p < 0,05$.

Ensayo de irritación ocular

La observación realizada después de la aplicación de la sustancia de prueba en el iris y la conjuntiva no mostró alteraciones. Sin embargo, se evidenciaron lesiones corneales de grado 1, las cuales desaparecieron a los siete días (tabla 1).

Tabla 1 - Resultados del ensayo de irritación ocular

Muestra	Tiempo	Córnea		HIO	Clasificación
		Descripción	N.		
1				5,41	No irritante
	1 h	Lesión grado 1	3		
	24 h	Lesión grado 1	3		
	48 h	Lesión grado 1	2		
		Lesión grado 2	1		
	72 h	Lesión grado 1	3		
2	1 h	Lesión grado 1	1	6,66	No irritante
		Lesión grado 2	2		
	24 h	Lesión grado 1	2		
		Lesión grado 2	1		
	48 h	Lesión grado 1	1		
		Lesión grado 2	1		
	72 h	Lesión grado 1	1		
		Lesión grado 2	2		
3	1 h	Lesión grado 1	2	6,25	No irritante
		Lesión grado 2	1		
	24 h	Lesión grado 1	2		
		Lesión grado 2	1		
	48 h	Lesión grado 1	2		
		Lesión grado 2	1		
	72 h	Lesión grado 1	2		
	4	1 h	Lesión grado 1		
24 h		Lesión grado 1	3		
48 h		Lesión grado 1	2		
		Lesión grado 2	1		
72 h		Lesión grado 1	2		
		Lesión grado 2	1		
5	1 h	Lesión grado 2	3	6,25	No irritante
	24 h	Lesión grado 1	3		
	48 h	Lesión grado 1	2		
		Lesión grado 2	1		
	72 h	Lesión grado 1	3		

El incremento de peso corporal fue ligero durante el ensayo, aunque no fue significativo con $p < 0,05$.

Actividad genotóxica mediante el test de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón

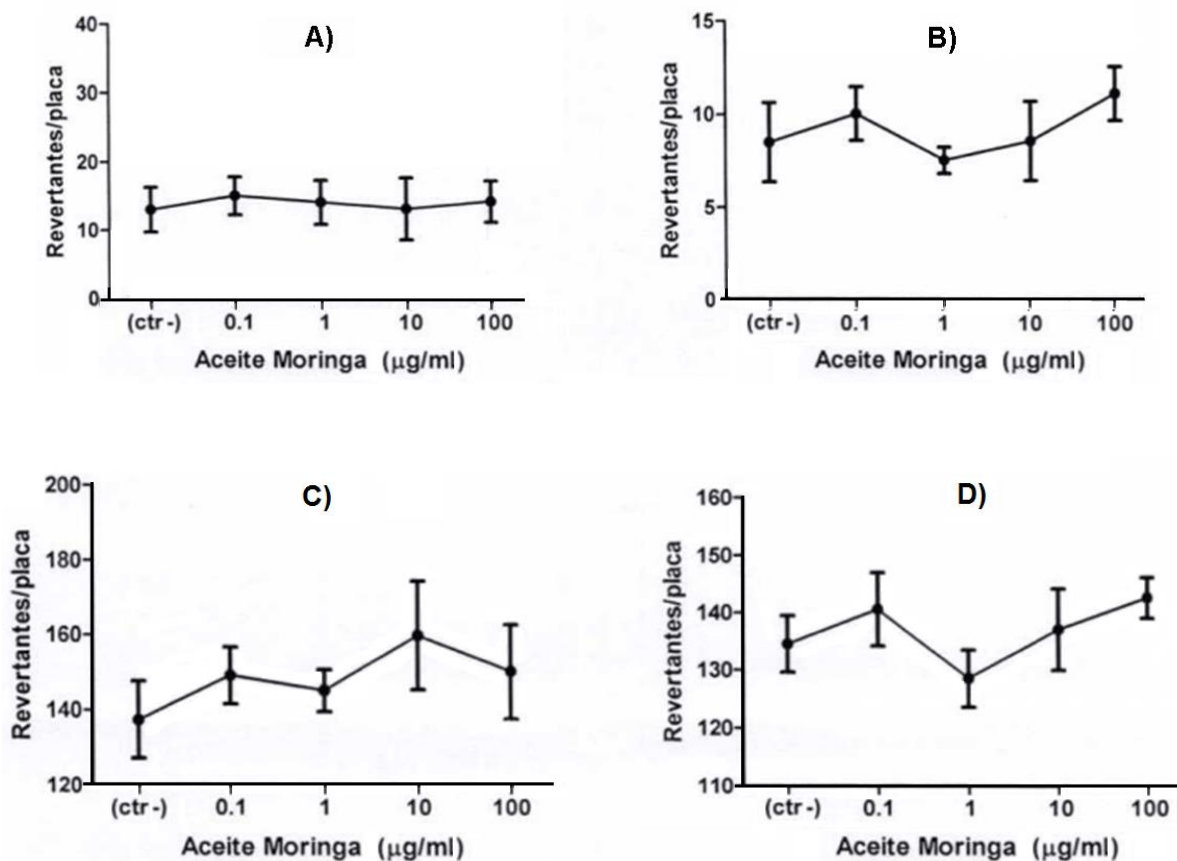
El tratamiento con aceite de *Moringa oleifera* (mg/kg peso corporal) en el grupo no tratado mostró índice de PCE/NCE como marcador de citotoxicidad. La frecuencia de PCE con micronúcleos (MN/PCE/1000) como marcador de daño aneugénico-clastogénico sobre la médula ósea de ratones machos fue de $1,40 \pm 0,35$ y $0,12 \pm 0,20$, respectivamente.

En los grupos tratados de 10, 100 y 1000, los valores de PCE/NCE obtenidos resultaron $1,83 \pm 0,10$, $1,62 \pm 0,16$ y $1,56 \pm 0,07$. Los de MN/PCE/1000 fueron $0,10 \pm 0,03$, $0,07 \pm 0,03$ y $0,13 \pm 0,03$, respectivamente. El control positivo con tratamiento de ciclofosfamida obtuvo un PCE/NCE de $0,53 \pm 0,07$ y MN/PCE/1000 de $5,38 \pm 0,75$. En el grupo del control negativo con tratamiento con CMC 0,5 % en 10 ml/kg peso corporal, el PCE/NCE fue de $1,51 \pm 0,32$ y MN/PCE/1000 de $0,80 \pm 0,04$, con una diferencia estadística de $p < 0,01$.

La administración oral del aceite de moringa no provocó toxicidad sobre la médula ósea de los ratones, lo que se evidenció por la ausencia de cambios en el índice PCE/NCE entre los grupos tratados, control negativo y el grupo no tratado. El aceite administrado por vía oral no indujo daños aneugénico, ni clastogénico sobre el tejido eritropoyético de los animales tratados, lo que se corroboró al no observarse aumento de la frecuencia de MN en las dosis empleadas, respecto a los controles negativos y los animales no tratados.

Actividad genotóxica mediante el sistema de ensayo reversión bacteriana en *Salmonella typhimurium* (salmonella/Microsoma)

La figura 2 muestra la evaluación del potencial mutagénico del aceite de moringa que se realizó con las cepas TA 98 y TA 100. Estas, detectan mutaciones por adiciones o deleciones de bases y mutaciones por sustitución de pares de bases, respectivamente. No se hizo evidente una respuesta dependiente de la concentración.



Se empleó como control negativo (ctr -) el tratamiento con dimetilsulfóxido 0,1 % (P/V).

Fig. 2 - Exposición de la cepa TA 98 frente al aceite de semillas de moringa. A) Sin S9. B) Con S9 y la cepa TA 100 en el aceite de semillas de moringa. C) sin S9. D) Con S9.

Actividad cicatrizante

La figura 3 refleja los grupos tratados con aceite de moringa (M) y la crema Hebermin (H). Hubo una reducción en el tamaño de la herida, menos en el grupo control. Aun cuando macroscópicamente existan diferencias, el procesamiento del tamaño de las heridas en todos los tiempos del estudio no se evidenció.

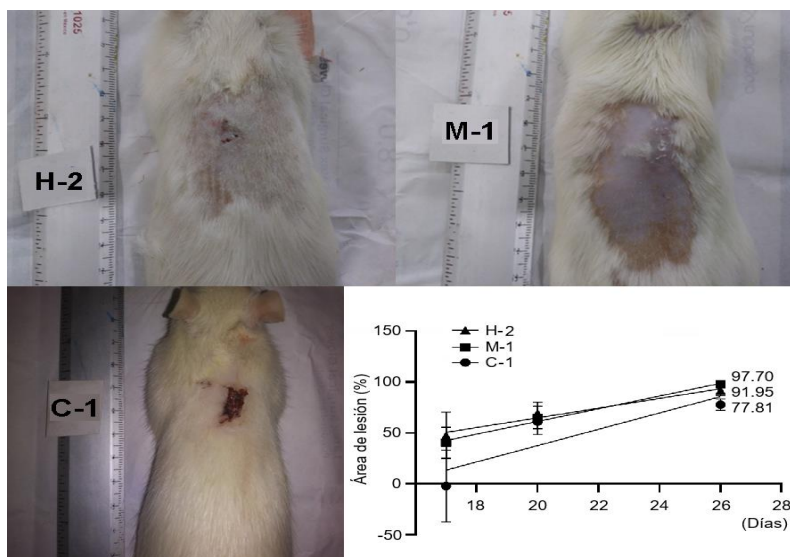


Fig. 3 - Estado y contracción de las heridas a los 14 días de los grupos de tratamiento con aceite de semillas de moringa (M-1), crema Hebermin (H-2) y el grupo control negativo (C-1) $p < 0,05$.

El estudio histológico del aceite de moringa en la epidermis y la dermis alcanzó una graduación media similar a la alcanzada por el grupo control positivo (tratado con Hebermin). Los grupos tratados con aceite de moringa y Hebermin alcanzaron la misma puntuación en la graduación para la epidermis $2,25 \pm 0,13$ y la dermis $2,5 \pm 0,13$. No obstante, un animal tuvo resultados idénticos a los animales del control sin tratamiento (1 punto) y dos mostraron resultados óptimos (3 puntos), tanto en la epidermis como en la dermis. En el caso del grupo tratado con Hebermin, a pesar de tener un solo animal con los resultados óptimos, el resto presentó algún indicio de cicatrización.

Sin embargo, aunque el análisis macroscópico de la contracción de las heridas en el grupo control negativo mostró un comportamiento similar en todos los grupos, en el estudio histológico casi todos los animales de ese grupo reflejaron una epitelización completa. En este punto, existieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control. No se mostró igual comportamiento entre los grupos administrados con aceite de semillas de moringa y el de Hebermin.

Evaluación del efecto dermorregenerador

Los animales del grupo I (control) mantuvieron la piel intacta durante el período experimental, no se mostró ninguna alteración. En los animales irradiados se observó baja o casi ninguna reacción de eritema en la piel. Sin embargo, el arrugamiento se observó hasta su grado máximo, lo que fue evidente a partir de las 48 h de la radiación. Demostró el daño

producido por la radiación UVB sobre la piel. El tratamiento con el aceite de semillas de moringa no disminuyó el grado de lesiones macroscópicas evaluadas. Este parámetro fue estadísticamente similar al grupo control irradiado.

En la observación histológica y las graduaciones dadas a cada animal, según la escala semicuantitativa para determinar el grado de dermoregeneración en piel sensibilizada con radiaciones UVB, el aceite de semillas de moringa obtuvo una graduación promedio de 2,2, al igual que el grupo control irradiado que no recibió tratamiento (tabla 3).

Tabla 3 - Descripción histopatológica y puntuación según la escala semicuantitativa de histopatología

Grupo	Animal	Descripción histopatológica	Puntuación histológica
1 Control no irradiado	1-1	Sin alteraciones aparentes (S.A.A)	0
	1-3	S.A.A	0
	1-4	Ligera acantosis, sin más alteraciones	0
	Promedio		0
2 Control irradiado	2-1	Degeneración de la capa granulosa del epitelio con edema en el estrato lúcido. Moderado daño de la matriz con una leve degradación de la fibrina en la unión dérmico-epidérmica. Anexos viables. Marcadas angiogénesis y reacción inflamatoria.	3
	2-2	Hiperplasia epitelial y reacción a cuerpos extraños en algunas zonas del epitelio. Se observan células quemadas entre 4 y 25 por campo e hiperqueratosis. Moderado daño de la matriz con una moderada degradación de la fibrina en la unión dérmico-epidérmica. Anexos viables. Moderada angiogénesis y discreta reacción inflamatoria.	2
	2-3	Zonas de leve aplanamiento epitelial con hiperqueratosis. Moderado daño de la matriz con una moderada degradación de la fibrina en la unión dérmico-epidérmica. Anexos viables. Moderada angiogénesis y reacción inflamatoria.	2
	2-4	Zonas de leve aplanamiento epitelial con hiperqueratosis. Mínimo daño de la matriz. Moderada angiogénesis y reacción inflamatoria. Anexos viables.	2
	2-5	Similar a 2-3	2
	Promedio		2,2
	3 Aceite de Moringa	3-1	Degeneración con aplanamiento epitelial y zonas de hiperplasia de la capa granulosa del epitelio con hiperqueratosis. Daño de la matriz con desorganización del colágeno y una marcada reacción inflamatoria. Moderada angiogénesis se observan algunos anexos poco viables.
3-2		Ligera hiperplasia de la capa granulosa del epitelio con edema en el estrato lúcido. Colágeno ligeramente desorganizado, con moderada degeneración de la fibrina en la unión dérmico-epidérmica, moderada angiogénesis y leve reacción inflamatoria.	2
3-3		Degeneración con aplanamiento epitelial. Daño de la matriz con una moderada degradación de la fibrina en la unión dérmico-epidérmica. Anexos viables. moderada angiogénesis y reacción inflamatoria.	2
3-4		Degeneración con aplanamiento epitelial y presencia de edema	2

		del estrato lúcido. Daño de la matriz con una moderada degradación de la fibrina en la unión dérmico-epidérmica. Anexos viables. Moderada angiogénesis y leve reacción inflamatoria.	
	3-5	Degeneración con aplanamiento epitelial. Daño de la matriz con una moderada degradación de la fibrina en la unión dérmico-epidérmica. Anexos viables. moderada angiogénesis y reacción inflamatoria.	2
	Promedio		2,2

Existieron diferencias significativas entre los grupos tratados, respecto al grupo control irradiado, mientras que entre los grupos placebo e irradiado no se encontraron diferencias significativas.

Discusión

Se constató que el aceite de semillas de moringa no presentó toxicidad. La administración no mostró síntomas o signos tóxicos a dosis de 2000 mg/kg (20 mL/kg), lo que concordó con los estudios de *Al Said*,⁽⁴⁾ *Ilesanmi*,⁽⁵⁾ y *Pérez*.⁽²⁸⁾ Esto puede estar atribuido a la ausencia de compuestos no lipídicos (alcaloides, glucósidos y enzimas) en las semillas empleadas en la extracción del aceite. *Ukwueze*⁽⁹⁾ informó que la presencia de estos compuestos dependió de las condiciones climáticas y geográfica donde creció la planta.

Los resultados expuestos y la OECD⁽²⁰⁾ del aceite de semillas de moringa puede considerarse seguro para el consumo humano, lo que puede enmarcar la DL₅₀ en el rango entre 2000 a 5000 mg/kg, ajustado en la categoría 5 del GHS (*Global Harmonized System*) o SGA (*Sistema Globalmente Armonizado*).

Los resultados de la irritación dérmica coinciden con *González*,⁽¹¹⁾ que no observó cambios en la piel del animal, edemas, eritemas u otro signo clínico.

En la irritación ocular se pudo observar que el IIO para las muestras de aceite de semillas de moringa clasificó como No irritante. Los cambios producidos en cornea fueron muy leves y con desaparición, también se consideró como No irritante.^(22,29,30) Esto avala el empleo del aceite de *Moringa oleifera* sobre las estructuras oculares sin riesgos de daños.

La actividad genotóxica evidenció que no hubo incrementos significativos de la frecuencia de revertantes para las cepas evaluadas.

La actividad cicatrizante mostró que tanto los tratamientos con aceite de moringa como con Hebermin favorecieron la cicatrización en el modelo de daño por quemaduras en piel de ratas. Estos resultados concuerdan con *González*,⁽¹¹⁾ que expuso que el aceite de moringa

favoreció la evolución del proceso de cicatrización durante el experimentación, aunque inferior al control utilizado.

La elevada capacidad antioxidante del aceite de moringa refuerza la actividad cicatrizante, ya que la quemadura es una herida traumática que resulta en un daño tanto local como sistémico, con evidentes cambios oxidativos manifestados por el incremento de la actividad de radicales libres. Este tipo de lesión oxida el tejido, aumenta la enzima xantina-oxidasa y productos de peroxidación lipídica, y se suman los radicales libres producidos por neutrófilos.⁽³¹⁾

El efecto dermorregenerador demostró resultados diferentes a los esperados. Sin embargo, permitieron concluir que el aceite de moringa no mostró tener un efecto dermorregenerador en piel dañada por radiaciones UVB. En este efecto, la cascada de eventos que producen la reparación del tejido lesionado, se conduce por factores de crecimiento generados por las células implicadas en el proceso como queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias. Estos factores de crecimiento regulan la proliferación y la diferenciación celular, y son importantes en el desarrollo embrionario, la regeneración tisular (a nivel fetal) y la reparación.⁽³²⁾ También actúan sobre la célula blanco uniéndose a nivel de membrana plasmática a un receptor específico.⁽³³⁾

El aceite de semillas de moringa no produce toxicidad aguda oral en las ratas, ni provoca daños clastogénico-aneugénico *in vivo*. Se considera seguro a las dosis estudiadas y puede ser una alternativa para el tratamiento de cicatrización de heridas y quemaduras similar al Hebermin, aunque no presenta efecto dermorregenerador. Es antiinflamatorio y evita la proliferación de microorganismos que afectan las heridas o índices que existen sobre las causas que las producen.

Referencias bibliográficas

1. Kou X, Li B, Olayanju JB, Drake JM, Chen N. Nutraceutical or Pharmacological Potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*. 2018;10(3):343. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10030343>
2. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(12):2141. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17122141>

3. Mitjans DG. Characterization of *Moringa oleifera*'s oils from different extraction methods. Redalyc. 2016 [acceso 14/06/2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/776/77649147013/>
4. Al Said MS, Mothana RA, Al Yahya MA, Al Blowi AS, Al Sohaibani M, Ahmed AF, *et al.* Edible oils for liver protection: Hepatoprotective potentiality of *Moringa oleifera* seed oil against chemical-induced hepatitis in rats. J Food Sci. 2012;77:T124-30. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02698.x>
5. Ilesanmi JO, Gungula DT, Nadro MS. Acute toxicity evaluation of mixture of neem (*Azadirachta indica*) and moringa (*Moringa oleifera*) seed oils in rats. Afr Food Sci. 2017;11(11):369-75. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJFS2017.1619>
6. Martín C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E, Puls J. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. Pastos y Forrajes. 2013 [acceso 14/06/2022];36(2):137-49. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942013000200001
7. Chivapat S, Sincharoenpokai P, Suppajariyawat P, Rungsipipat A, Phattarapornchaiwat S. Chantarateptawan V. Safety evaluations of ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. seed in experimental animals. Thai J Vet Med. 2012 [acceso 13/05/2022];42(3):343-52. Disponible en: <https://www.vet.chula.ac.th/tjvm/>
8. Al Anizi AA, Hellyer MT, Zhang D. Toxicity assessment and modelling of *Moringa oleifera* seeds in water purification by whole cell bioreporter. Water Res. 2014;56:77-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.045>
9. Ukwueze CK, Okogwu OI, Ebem EC, Nwonumara GN. Nwodo JN. Evaluation of the Influence of Geographical Location on Phytochemical Composition of *Moringa oleifera* Seeds. World Appl Sci J. 2019;37(3):196-201. DOI: <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2019.196.201>
10. Staughton J. 9 Amazing Benefits of Moringa Oil. Organic Facts. 2020 [acceso 13/05/2022]. Disponible en: <https://www.organicfacts.net/health-benefits/oils/moringa-oil.html>.
11. González C, Romero A. Comparación de actividad cicatrizante entre los aceites de las semillas de *Azadirachta indica* y *Moringa oleifera* en heridas cutáneas en ratas Wistar [tesis de grado]. Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2017.
12. Komarcević A. The modern approach to wound treatment. Med Pregl. 2000 [acceso 13/05/2022];53(7-8):363-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11214479/>

13. Senet P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Dermatologie. 2007;98:10. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(08\)51434-8](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(08)51434-8)
14. Esquirol Caussa J, Herrero Vila E. Factor de crecimiento epidérmico, innovación y seguridad. Med Clin (Barc). 2015;145(7):305-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.09.012>
15. Compaoré WR, Nikièma PA, Bassolé HIN, Savadogo A, Mouecoucou J. Chemical composition and antioxidative properties of seeds of *Moringa oleifera* and pulps of *Parkia biglobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in Burkina Faso. Current Research J Biolog Scienc. 2011 [acceso 13/05/2022];3(1):64-72. Disponible en: <https://maxwellsci.com/print/crjbs/v3-64-72.pdf>
16. Arenales RB. Efecto de las suspensiones de semillas de *Moringa oleifera* Lam. sobre la coagulación de aguas turbias naturales [tesis de doctorado]. Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC; 1991.
17. Gómez DM, Pita VB, Zumalacárregui B. Caracterización de aceites de las semillas de *Moringa oleifera* a partir de la extracción por diferentes métodos. Rev Colomb Biotecnol. 2016;XVIII(2):106-11. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.54324>
18. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 1983;113(3-4):173-215. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
19. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. 2000;455(1-2):29-60. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6)
20. OECD. Guideline for testing of chemical Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method N°423. NIEHS. 2001 [acceso 13/05/2022]. Disponible en: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf
21. OECD. Acute dermal Irritación/corrosión. Guideline for testing chemical. N° 404. 2015 [acceso 13/05/2022]. Disponible en: <https://www.oecd.org/env/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion-9789264242678-en.htm>
22. García G, Palacios M, Gazapo R, Pérez L. Elaboración de una metodología para la evaluación de la irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos. BVSALUD [acceso 13/05/2022]. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-74704>
23. Hayashi M, Mac Gregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated

- treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2000 [acceso 13/05/2022];35(3):234-52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10737958/>
24. Guideline IH. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Expert Working Group. 2011 [acceso 13/05/2022]. Disponible en: <https://www.bibra-information.co.uk/ich-guidance-on-genotoxicity-testing/>
25. OECD. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. Guidelines for the Testing of chemicals. OECD. 1997 [acceso 13/05/2022]. Disponible en: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en
26. Berlanga J, Cibrian D, Guillen I, Freire F, Alba JS, López Saura P, *et al.* Methylglyoxal administration induces diabetes-likeH microvasculra change and perturb the healing process of cutaneous wounds. Clin Sci. 2005;109(1):83-95. DOI: <https://doi.org/10.1042/cs20050026>
27. Regalado EL, Rodríguez M, Menéndez R, Concepción AA, Nogueiras C, Laguna A, *et al.* Repair of UVB-Damaged Skin by the antioxidant Sulphated Flavone Glycoside Thalassiolin B Isolated from the Marine Plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. Mar Biotechnol. 2009;11:74-80. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10126-0089123-8>
28. Pérez Pérez V. Acute toxicity and chemical composition of oil *Moringa oleifera*. TIP Rev Esp Cienc Quím Biol. 2020;23:1-9. DOI: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.264>
29. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods to the study of the irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. SCIRP. 1994 [acceso 13/05/2022]. Disponible en: [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=677786](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=677786)
30. ISO. ISO 10993-10:2015: Norma Cubana. Biological evaluation of medical devices. Part 10: Test for irritation and delayed - type hypersensitivity. Redalyc. 2015 [acceso 13/05/2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/1812/181263502003/181263502003.pdf>
31. González Quevedo R, Sotolongo B, Quert Álvarez, Corral Salvadó A, Batista Veranes M. Crema epitelizante de clorofila, carotenos y vitaminas aplicada en heridas abiertas

experimentales. Rev Cubana Med. Milit. 2001 [acceso 13/05/2022];30(4):236-40. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v30n4/mil04401.pdf>

32. Enoch S, Leaper DJ. Basic Science of Wound Healing. Surgery. 2008;26:31-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2007.11.005>

33. Korsching S. The neurotrophic factor concept: A reexamination. J Neurosci. 1993;13:2739-48. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-07-02739.1993>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Vivian Lago Abascal, Gretter León Suárez y Efraín Rodríguez Jiménez.

Curación de datos: Gretter León Suárez y Efraín Rodríguez Jiménez.

Análisis formal: Gretter León Suárez y Efraín Rodríguez Jiménez.

Investigación: Vivian Lago Abascal, Gretter León Suárez y Efraín Rodríguez Jiménez.

Metodología: Gretter León Suárez y Efraín Rodríguez Jiménez.

Administración del proyecto: Efraín Rodríguez Jiménez.

Supervisión: Efraín Rodríguez Jiménez.

Visualización: Vivian Lago Abascal y Efraín Rodríguez Jiménez.

Redacción del borrador original: Vivian Lago Abascal.

Redacción, revisión y edición: Efraín Rodríguez Jiménez.