

Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Laboratorio de Productos Naturales



Trabajo Especial de Grado en Licenciatura de Química

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Autor: Robert José Aljorna Molero

C.I:26.467.087

Tutor: Dr. Freddy Carrillo
Co-Tutor: Dr. Juan Amaro

Mérida-Venezuela

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a Dios. En los momentos más oscuros de mi vida, cuando la duda y la adversidad se hicieron presentes, Él fue la luz que iluminó mi camino y me recordó que soy capaz de enfrentar cualquier desafío. De alguna manera, Dios siempre estuvo presente, manifestándose en el amor de mis padres y familiares, en el apoyo incondicional de mis amigos, en la paciencia y dedicación de mis profesores, y en la bondad que encuentro a diario en las personas que me rodean. Estas muestras de amor y apoyo son pruebas irrefutables de que Dios nunca me ha abandonado, siempre me ha acompañado en cada paso de mi camino.

Quiero tomar un momento para expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres, Nayary Molero y Pedro Aljorna, quienes me han dado los regalos más preciosos de todos: la vida y su amor incondicional. Ellos han sido mi mayor inspiración y mi motor para enfrentar cada día con valentía y convertirme en una mejor persona.

También quiero agradecer a mi abuela, Mayela Albarrán, quien ha sido como una segunda madre para mí. Siempre ha estado a mi lado, brindándome su amor, sabiduría y apoyo en cada paso que he dado. Su presencia en mi vida ha sido un regalo invaluable, y le estoy eternamente agradecido por todo lo que ha hecho por mí.

No puedo dejar de mencionar a mi hermanito, Ikran Aljorna, quien me ha enseñado una de las lecciones más importantes de mi vida: amar y proteger a los demás de la misma manera en que nos amamos y protegemos a nosotros mismos. Su pureza y bondad han dejado una huella indeleble en mi corazón, y siempre buscaré ser un modelo a seguir para él.

Seguidamente, quiero agradecer a mis abuelos (as), tíos (as), primos (as) y demás familiares, que de una u otra manera han sido de apoyo a lo largo de mi vida y me han apoyado en todos los aspectos posibles.

Quiero dedicar un especial agradecimiento al Dr. Freddy Carrillo, uno de los profesores más brillantes que he tenido el privilegio de conocer. Fue él quien confió en mí y me brindó la increíble oportunidad de trabajar junto a él en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Los Andes. No existen palabras suficientes para expresar la inmensa gratitud que siento hacia él por su apoyo y mentoría en esta investigación. Gracias a su guía, pude unir mis mayores pasiones: la química, las plantas y los animales.

Además, también quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Juan Amaro, quien a pesar de la gran distancia, brindó una ayuda invaluable como cotutor, permitiendo que este trabajo alcanzara la excelencia con su experiencia y consejos. La contribución del Dr. Juan Amaro ha sido fundamental para el éxito de esta investigación. A pesar de la distancia física, su guía y apoyo constante han sido invaluable.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Expreso mi total agradecimiento a mis jurados, la Dra. Marietta Vizcaya y la Dra. Yelitza Delgado, cuya contribución ha sido invaluable en el desarrollo de esta tesis. Su experiencia y conocimiento en sus respectivos campos han enriquecido significativamente mi investigación, brindando una perspectiva crítica y constructiva.

Agradezco a los profesores Carolina Santiago, Roberto Rouse, Carmelo Rosquette, Marilia Guillen y Francisco López. A lo largo de mi carrera, sus enseñanzas han sido una fuente inagotable de motivación y han avivado aún más mi pasión por la química.

Mi más sincero agradecimiento a mis amigas y compañeras de universidad Mariana Serrano, María Benítez, Mariana Salcedo, Mariangélica Mora y Ámbar Velázquez. A lo largo de nuestra carrera, su amistad y apoyo han sido un pilar fundamental en mi experiencia universitaria. Siempre recordaré con cariño esas tardes de laboratorio en las que nuestras risas nunca faltaron.

Agradezco de corazón a Elio Quintero y a su familia por ser un apoyo invaluable durante estos últimos años de mi carrera. Su generosidad y amabilidad han sido mi refugio y han actuado como un segundo hogar para mí. No puedo expresar con palabras lo agradecido que estoy por su apoyo incondicional. En momentos de dificultad y desafíos, su presencia y apoyo han sido una fuente de fortaleza y consuelo. Siempre han estado dispuestos a brindarme su ayuda y orientación, y por eso les estaré eternamente agradecido.

A la Dr. Belkis Quiñones, Dr. Yespsys Montero, Prof. Ramón Méndez y a todo el personal de Bioterio de la Universidad de Los Andes; por su asesoría y apoyo, que hicieron posible llevar a cabo la parte más importante de mi investigación.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a todos los animales de experimentación, cuyas vidas han contribuido enormemente al avance de la ciencia, permitiendo así mejorar la calidad de vida tanto de los seres humanos como de otros seres vivos. Reconozco y valoro el sacrificio y la importancia de estos animales en la investigación científica.

“Señor, concédeme la serenidad para aceptar todo aquello que no puedo cambiar, el valor para cambiar lo que soy capaz de cambiar, y sobre todas las cosas, la sabiduría para entender la diferencia”

Reinhold Niebuhr

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Resumen

En el presente trabajo de investigación, se estudió el efecto sobre el crecimiento capilar de extractos derivados de la planta del romero (*Rosmarinus officinalis*) de manera individual (aceite esencial, hidrolato y extracto alcohólico) y en conjunto (en forma de un champú y tónico capilar) en ratones macho de la línea C57BL6//BIOU, repartidos en 7 grupos distintivos: agua destilada (AD), aceite esencial (AE), extracto (ER), hidrolato (HR), tónico capilar (TC), champú (CH) y minoxidil al 5% (MXD). El crecimiento fue evaluado durante 5 semanas, mediante dos métodos: una escala de crecimiento con registro fotográfico y la medición de pelos tomados por tracción. El crecimiento capilar producido por estos tratamientos fue contrastado con un grupo control negativo (agua destilada) y control positivo (minoxidil al 5%). La escala de crecimiento empleada demostró que, a los ratones que se les proporcionaban tratamientos que contenían estos extractos (AE, ER, HR, TC y CH), exhibían un crecimiento capilar considerable, sin embargo, esta escala demostró tener serias limitaciones a la hora de evaluar ratones con nevo melanocítico (lunar) en los ratones del grupo AD. Por su parte, la medición de longitud de los pelos, demostró que dichos grupos de tratamiento (AE, ER, HR, TC y CH), presentan un crecimiento estadísticamente superior que el de los grupos control (p -valor $< 0,05$). Finalmente, se concluyó que los extractos empleados en esta investigación (aceite esencial, hidrolato y extracto alcohólico) estimulan el crecimiento capilar en mayor medida que el fármaco comercial minoxidil.

Abstract

In the present research work, the effect on hair growth of extracts derived from the rosemary plant (*Rosmarinus officinalis*) was studied individually (essential oil, hydrolate and alcoholic extract) and together (in the form of a shampoo and tonic). capillary) in male mice of the C57BL6//BIOU line, divided into 7 different groups: distilled water (AD), essential oil (AE), extract (ER), hydrosol (HR), hair tonic (TC), shampoo (CH) and 5% minoxidil (MXD). Growth was evaluated for 5 weeks, using two methods: a growth scale with photographic recording and measurement of hairs taken by traction. The hair growth produced by these treatments was contrasted with a negative control group (distilled water) and positive control (5% minoxidil). The growth scale used demonstrated that the mice that were given treatments containing these extracts (AE, ER, HR, TC and CH) exhibited considerable capillary growth; however, this scale proved to have serious limitations when it came to to evaluate mice with melanocytic nevus (mole) in the AD group mice. For its part, the measurement of hair length showed that these treatment groups (AE, ER, HR, TC and CH) present statistically greater growth than that of the control groups (p -value < 0.05). . Finally, it was concluded that the extracts used in this research (essential oil, hydrolate and alcoholic extract) stimulate hair growth to a greater extent than the commercial drug minoxidil.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Índice

Introducción	14
1. Marco teórico	15
1.1.El cabello	15
1.1.1. Composición química del cabello.....	16
1.1.2. Morfología del cabello.....	21
1.1.3. Ciclo de crecimiento del cabello.....	21
1.1.4. Alopecia	23
1.1.4.1. Alopecia androgénica.....	24
1.1.4.2. Fármacos empleados en el tratamiento de la alopecia androgénica.....	26
1.1.4.3. Productos naturales en el tratamiento de la alopecia androgénica	27
1.2.Champú	29
1.2.1. Componentes del champú.....	29
1.2.1.1.Tensoactivos o surfactantes	29
1.2.1.2.Viscosantes	31
1.2.1.3.Colorantes y fragancias.....	31
1.2.1.4.Conservantes	31
1.2.1.5.Aditivos.....	32
1.2.2. Proporción de los componentes en el champú.....	32
1.3.Tónico capilar	33
1.3.1. Componentes del tónico capilar.....	33
1.3.1.1.Sustancias activas.....	33
1.3.1.2.Vehículos	33
1.3.1.3.Emolientes.....	34
1.3.1.4.Colorantes y fragancias.....	34
1.3.2. Proporción de los componentes en los tónicos capilares	34

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

1.4.Romero	35
1.4.1. Clasificación taxonómica.....	35
1.4.2. Descripción botánica.....	35
1.4.3. Hábitat.....	36
1.4.4. Fitoquímica y actividad biológica.....	36
1.4.5. Usos medicinales	39
1.4.6. Uso del <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero) en el tratamiento de la alopecia androgénica.....	40
1.4.7. Aceite esencial de romero.....	41
1.4.8. Hidrolato de romero.....	42
1.4.9. Extracto alcohólico de romero	42
1.4.10. Extracción de productos naturales	42
1.4.10.1. Variables en un proceso extractivo.....	43
1.4.10.2. Métodos de extracción de productos naturales	44
1.5.Ratón (<i>Mus musculus</i>)	46
1.5.1. Clasificación taxonómica.....	46
1.5.2. Descripción zoológica.....	46
1.5.3. Hábitat.....	47
1.5.4. Ratón de laboratorio.....	47
1.5.5. Líneas genéticas de ratón (<i>Mus musculus</i>) empleadas en la investigación científica.....	48
1.5.6. Estudios de promoción capilar en ratones C57BL/6.....	50
1.6.Pruebas estadísticas	52
1.6.1. Prueba de Shapiro-Wilk.....	52
1.6.2. Prueba de ANOVA	54
1.6.3. Método de Tukey	55
2. Justificación	56
3. Hipótesis	57
4. Objetivos	57
4.1. Objetivo general	57
4.2. Objetivos específicos	57
5. Procedimiento experimental	58
5.1.Elaboración del extracto de romero	58
5.1.1. Materiales y equipos empleados	58

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

5.1.2. Recolección, secado y preparación del material vegetal	59
5.1.3. Obtención del extracto etanólico de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>	59
5.2.Elaboración del champú y tónico capilar	61
5.2.1. Materiales y equipos empleados	61
5.2.2. Formulación del champú y tónico capilar.....	62
5.2.3. Elaboración del champú.....	62
5.2.4. Elaboración del tónico capilar	63
5.3.Preparación del aceite esencial de romero al 5%	63
5.4.Preparación del extracto de romero al 5%	63
5.5.Ensayo en ratones C57BL6//BIOU.....	63
5.5.1. Aval del Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA).....	63
5.5.2. Elección de la línea	64
5.5.3. Elección del sexo	64
5.5.4. Tamaño de la muestra	64
5.5.5. Condiciones ambientales y de alojamiento.....	66
5.5.6. Procedimiento experimental	66
5.5.7. Análisis estadístico.....	70
6. Resultados y discusión	72
6.1.Registro fotográfico y escala de crecimiento capilar	72
6.2.Medición de longitud de pelos.....	76
7. Conclusiones	88
8. Recomendaciones	90
9. Referencias bibliográficas	91
10. Anexos	100

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Índice de figuras

Figura 1. Estructura anatómica de la unidad pilo-sebácea del cabello.....	15
Figura 2. Representación tridimensional de la α -queratina	19
Figura 3. Representación tridimensional de la β -queratina	20
Figura 4. Vista microscópica del cabello.....	21
Figura 5. Fases del ciclo de crecimiento del pelo	22
Figura 6. Representación tridimensional de la enzima 5- α -reductasa (5aR).....	24
Figura 7. Efecto de la enzima 5- α -reductasa, dihidrotestosterona y testosterona en la pérdida del cabello	25
Figura 8. Acomodo de un tensoactivo en una interfaz agua-aceite.....	29
Figura 9. <i>Rosmarinus officinalis</i>	35
Figura 10. Fotografías globales de los pacientes del grupo MTS+THS (minoxidil al 5% + extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>) MTS (extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>) al inicio del tratamiento y a la semana 36.....	41
Figura 11. Esquema de un extractor Soxhlet	45
Figura 12. <i>Mus musculus</i>	47
Figura 13. Ratón de la línea consanguínea C57BL/6.....	49
Figura 14. Ratón de la línea consanguínea BALB/c	49
Figura 15. Ratón de la línea consanguínea Nude.....	50
Figura 16. Observación macroscópica del pelaje en ratones C57BL/6. Se afeitó el lomo de los ratones y se aplicaron tópicamente los compuestos de ensayo durante 4 semanas. SA; solución salina, JO; aceite de jojoba, MDX; minoxidil al 3 %, PEO; aceite de menta al 3%	51
Figura 17. Puntuaciones para la evaluación del crecimiento capilar	52
Figura 18. Ejemplo gráfico de un conjunto de una distribución normal	52
Figura 19. Gráficos de distribución normal.....	53
Figura 20. Explicación gráfica de la prueba de ANOVA y el cálculo de F	55
Figura 21. Separación de las hojas de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	59

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Figura 22. Montaje del equipo empleado en la extracción	59
Figura 23. A) Extracto sin concentrar. B) Extracto concentrado	60
Figura 24. Extracto seco de romero	60
Figura 25. Efectos promotores en el crecimiento capilar de la timosaponina BII	65
Figura 26. Observaciones macroscópicas del crecimiento del pelo y ciclo del cabello	65
Figura 27. Representación del marcado de los ratones: 1) Sin Marca (SM). 2) Oreja Izquierda Cortada (OIC). 3) Oreja Derecha Cortada (ODC). 4) Ambas Orejas Cortadas (AOC)	67
Figura 28. Representación del área afeitada en la región dorsal de los ratones.....	67
Figura 29. Representación de la caja de observación fabricada	68
Figura 30. Puntuaciones para la evaluación del crecimiento capilar	69
Figura 31. Procedimiento esquematizado de la medición de pelos obtenidos por tracción	70
Figura 32. Ratones AD1, AD2 y AD3 que presentaban nevo melanocítico (lunar), en la región dorsal de su cuerpo.....	72
Figura 32. Observación macroscópica de la región dorsal de los ratones C57BL6//BIOU. AD (agua destilada), AE (aceite esencial de romero al 5%), ER (extracto de romero al 5%), HR (hidrolato de romero), TC (tónico capilar), CH (champú) y MXD (minoxidil al 5%)	73

Índice de tablas

Tabla N°1: Otras drogas empleadas para el tratamiento del AGA, mecanismo de acción y efectos secundarios	27
Tabla N°2: Extractos de algunas plantas con potencial de crecimiento del cabello	28
Tabla N°3: Proporciones genéricas de los componentes presentes en el champú	32
Tabla N°4: Proporciones genéricas de los componentes presentes en los tónicos capilares.....	34
Tabla N°5: Taxonomía del romero	35
Tabla N°6: Principales moléculas bioactivas del romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	36
Tabla N°7: Taxonomía del ratón.....	46
Tabla N°8: Reactivos empleados en la elaboración del extracto de romero	58
Tabla N°9: Datos empleados para la determinación de la pureza del extracto de romero	61
Tabla N°10: Formulación del champú	62
Tabla N°11: Formulación del tónico capilar	62
Tabla N°12: Marcas de identificación de los ratones.....	67
Tabla N°13: Dosis, en mL/Kg y mg/Kg, de aceite esencial, hidrolato y extracto de romero, en cada producto aplicado.....	68
Tabla N°14: Escala de puntaje de crecimiento capilar.....	69
Tabla N°15: Media grupal en la escala de crecimiento capilar de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; de la semana 1 a la 5	74
Tabla N°16: Valores de longitud del pelo (en mm), de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; entre las semanas 2 y 5	76
Tabla N°17: Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD entre las semanas 2 y 5	78
Tabla N°18: Resultados de la prueba ANOVA de una vía, de la comparación del largo del pelo de todos los grupos de estudio.....	79
Tabla N°19: Prueba de ANOVA con análisis <i>post-Hoc</i> bajo la prueba de Tukey de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, asumiendo como HDS a los grupos AD y MXD	81

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Tabla N°20: Resultados de la prueba ANOVA de una vía, de la comparación del largo del pelo de los grupos AE, ER, HR, TC y CH.....	82
Tabla N°21: Prueba de comparación múltiple de Tukey para los grupos AE, ER, HR, TC y CH; entre las semanas 2 y 5.....	83
Tabla N°22: Datos de longitud (en mm) de los pelos dentro y fuera del área, de los ratones de los grupos AE, ER, HR, TC y CH; en la semana 5	84
Tabla N°23: Resultados de la prueba ANOVA de una vía, en la comparación de la longitud del pelo dentro y fuera del área afeitada de los ratones de los grupos AE, ER, HR, TC y CH	85
Tabla N°24: Datos de longitud (en mm) de los pelos dentro de la zona afeitada de los grupos AE, ER, HR, TC y CH; y de los ratones del grupo CC.....	86

www.bdigital.ula.ve

Índice de gráficos

- Gráfico N°1:** Comparación del efecto del crecimiento capilar, mediante la escala de puntaje, en ratones C57BL6//BIOU luego de la aplicación tópica de agua destilada (AD), aceite esencial al 5% (AE), extracto de romero al 5% (ER), hidrolato de romero (HR), tónico capilar (TC), champú (CH) y minoxidil al 5% (MXD) 75
- Gráfico N°2:** Comparación en el crecimiento capilar (medido en mm) en forma de columnas, de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; entre las semanas 2 y 5 77
- Gráfico N°3:** Comparación en el crecimiento capilar (medido en mm) en forma de cajas, de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; entre las semanas 2 y 5 77
- Gráfico N°4:** Resultados de la prueba ANOVA de la longitud del pelo de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD, en las semanas 2 y 5. El resultado de la prueba se indica con (**), el cual expresa que $p < 0,05$ 80
- Gráfico N°5:** Prueba de ANOVA con análisis *post-Hoc* bajo la **prueba de Tukey** de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, asumiendo como HDS a los grupos AD y MXD. El símbolo (*) indica que la media del grupo presenta diferencias estadísticamente significativas con los grupos AD y MXD ($p < 0,05$) 81
- Gráfico N°6:** Resultados de la prueba ANOVA de la longitud del pelo de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, en las semanas 2 y 5 83
- Gráfica N°7:** Crecimiento capilar (en mm) de los grupos AE, ER y HR entre las semanas 2 y 5 84
- Gráfica N°8:** Comparación de la longitud del pelo dentro y fuera del área afeitada, de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, al final de la semana 5 85
- Gráfica N°9:** Comparación de la longitud del pelo (en mm) de los grupos tratados (AE, ER, HR, TC y CH) con respecto al grupo CC. El símbolo (ns) señala que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 86
- Gráfica N°10:** Comparación del crecimiento con el método 1 (escala de crecimiento) y método 2 (medición de pelos) 87

Introducción

El hombre, desde sus inicios, ha tratado sus enfermedades con el uso de los recursos que tenía a su alcance, siendo el Reino Vegetal su principal proveedor de fuentes terapéuticas; hecho reportado en todas las civilizaciones antiguas. Con el avance de la ciencia, se han comprobado las propiedades de las plantas medicinales, haciendo con estas plantas tratamientos más eficaces y seguros (Caro *et al.*, 2020; Nélica, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce muchas plantas medicinales y tóxicas en su manual “*Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2014-2023*”. Este manual engloba el uso de las plantas medicinales, en los tratamientos más naturales, inocuos, efectivos, de bajo costo, además de estar al alcance de la población general y ser ampliamente aceptadas por la misma (OMS, 2014).

Con el gran potencial terapéutico de las plantas medicinales, no es de extrañar que desde tiempos muy tempranos el hombre estuviera interesado en emplearlas con fines estéticos, como el cuidado del cabello. En la gran mayoría de culturas antiguas, el cabello es una representación de estatus social y del atractivo personal, en donde la ausencia del mismo causaba, la mayoría de las veces, un gran impacto negativo tanto en hombres como mujeres (Carmona *et al.*, 2009; Brave & Dighe, 2016).

Muchas plantas se han utilizado en el cabello por diversas circunstancias, siendo bastante razonable la afirmación, de que la mayoría de las conocidas por el hombre, hayan sido probadas en el cabello en algún momento de la historia. (Brave & Dighe, 2016).

Una de las plantas que ha despertado el interés de los investigadores es el *Rosmarinus officinalis*, comúnmente conocida como romero, esta es una planta perteneciente a la familia *Lamiaceae* (Barve & Dighe, 2016), siendo autóctona de los países rivereños al Mar Mediterráneo (Murata *et al.*, 2013). Su uso está ampliamente ligado a la gastronomía (Tigist *et al.*, 2016).

Existen diversos estudios que demuestran que, el extracto de *Rosmarinus officinalis* presenta una capacidad antiandrogénica (evitan la caída del cabello) (de Macedo *et al.*, 2020; Murata *et al.*, 2013; Masound *et al.*, 2020). Bajo este contexto se justifica el objetivo de la presente investigación; consiste en estudiar la capacidad de crecimiento capilar de productos derivados del romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Marco teórico

1.1. El cabello

El cabello es una estructura fina y alargada presente en el estrato córneo (capa más externa) de la piel, que se constituye principalmente por la proteína queratina (Aranguri & Ramos, 2016). De esta manera, la presencia de cabello es una característica propia de los mamíferos, donde presenta y cumple algunas de las siguientes funciones: aislante térmico, protección ante los rayos ultravioletas, camuflaje (en algunas especies animales), entre otras (Restrepo, 2010; Reyes *et al.*, 2007).

En los seres humanos, el cabello ha perdido gran parte de su función biológica como consecuencia de su evolución a lo largo del tiempo, por ende, se convirtió en un órgano vestigial. Por lo tanto, su función protectora se ha limitado principalmente al cráneo, ojos (cejas y pestañas), fosas nasales, axilas y área genital (Restrepo, 2010).

El cabello nace de una estructura conocida como unidad pilo-sebácea, que se constituye de la unión de las glándulas sebáceas, músculo erector del pelo y el folículo piloso. Dicha estructura se conforma de hasta 10 tipos de células diferentes, las cuales aparecen, desaparecen o se modifican en función al ciclo del crecimiento del cabello, o a la estimulación hormonal en algún momento dado (Restrepo, 2010; Schneider *et al.*, 2009; Buffoli *et al.*, 2014).

Cada cabello se compone de una raíz ubicada en un folículo piloso de la dermis y de un tallo que se proyecta hacia arriba por encima de la epidermis; a su vez, el folículo piloso está unido a la papila dérmica, que se compone de tejido conjuntivo y vasos sanguíneos, los cuales proporcionan los nutrientes necesarios para su crecimiento (Aranguri & Ramos, 2016; Granados, 2017).

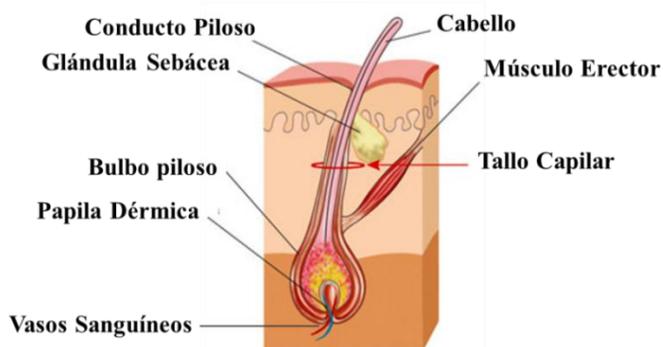


Figura 1. Estructura anatómica de la unidad pilo-sebácea del cabello, en donde se muestran sus principales estructuras anatómicas: cabello, conducto piloso, glándula sebácea, músculo erector, tallo capilar, papila dérmica y vasos sanguíneos (Restrepo, 2010).

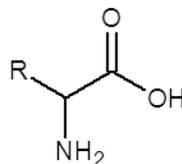
Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

1.1.1. Composición química del cabello

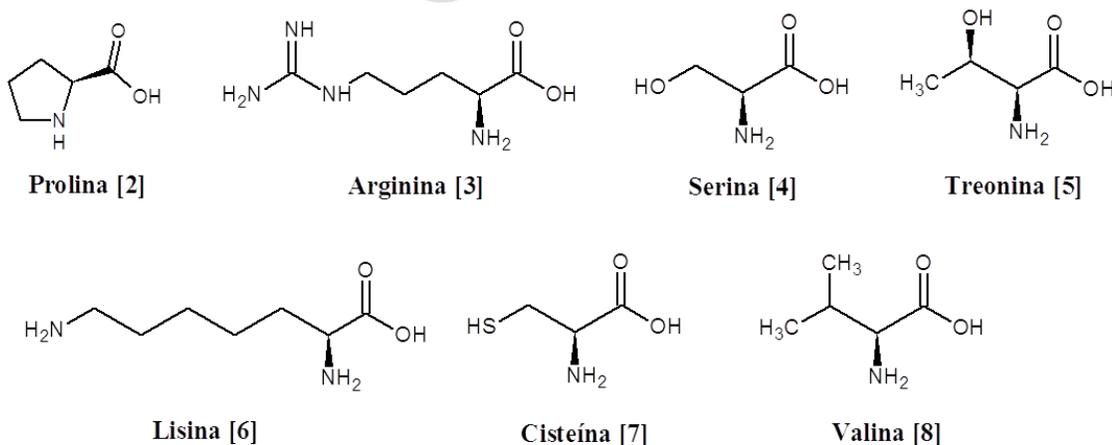
Químicamente hablando, el cabello se conforma por:

- **Aminoácidos:** son aquellas moléculas que presentan un grupo amino (-NH₂) y cualquier tipo de grupo ácido (-COOH), sin embargo, este término se emplea mayoritariamente para hacer referencia a los ácidos α -amino, llamados así, debido a que el grupo amino está enlazado al átomo de carbono α (alfa) adyacente al grupo carbonilo [1] (Wade, 2012).



Estructura general de los α -aminoácidos [1]

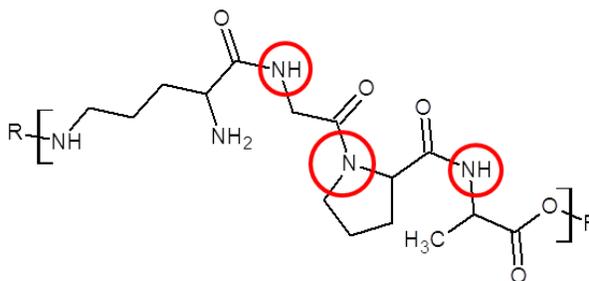
Estos presentan una gran importancia a nivel biológico, ya que son los “bloques de construcción” de las proteínas, y estas a su vez son las estructuras que componen a cualquier tejido vivo (Morales *et al.*, 2017). El cabello se compone aproximadamente de un 70% de aminoácidos, tales como: prolina [2], arginina [3], serina [4], treonina [5], lisina [6], cisteína [7] y valina [8] (Aranguri & Ramos, 2016).



Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

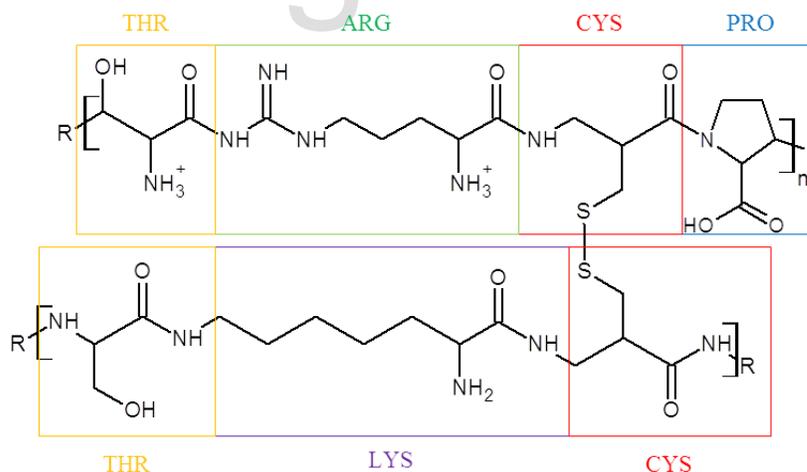
Robert Aljorna

- **Proteínas:** son las moléculas orgánicas más abundantes en los animales, las cuales presentan funciones importantes a nivel estructural y bioquímico. Estas son consideradas como polímeros de los α -aminoácidos [1], es decir, son largas cadenas que se componen por la repetición de una o varias unidades de monómeros, que en este caso son los aminoácidos, que se unen entre sí mediante enlaces amida [9] (Wade, 2012).



Enlaces amida en una pequeña porción de proteína [9]

La proteína más abundante en el cabello es la queratina [10], la cual constituye aproximadamente el 28% del mismo. Esta se compone de dos cadenas conformadas por los aminoácidos prolina [2], arginina [3], serina [4], treonina [5], lisina [6], valina [8] y, principalmente, cisteína [7]; los cuales se unen entre sí para formar microfibras, que tienen como función principal la protección de las capas más externas del cabello, uñas y pezuñas en los mamíferos (Reyes *et al.*, 2007).



THR: Treonina, ARG: Arginina, CYS: Cisteína,
PRO: Prolina, LYS: Lisina.

Queratina [10]

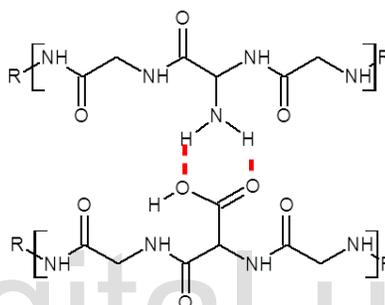
Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

Robert Aljorna

Según su estructura y componentes, estas se pueden clasificar en dos grupos: la alfa y la beta. La α -queratina se encuentra presente en el cabello y uñas del ser humano, y se conforma mayoritariamente por monómeros de cisteína, formando largas hebras que se unen entre ellas mediante la formación de puentes disulfuro, puentes de hidrógeno y puentes salinos permitiendo así que la proteína se pliegue sobre sí misma obteniendo una forma helicoidal (Reyes *et al.*, 2007).

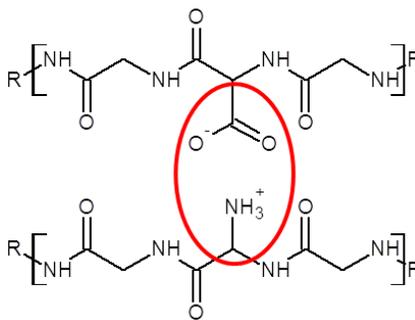
Las diversas propiedades químicas y físicas en la queratina se deben, principalmente, a los distintos tipos de enlaces que se pueden presentar a lo largo de su estructura, siendo estos:

- ✓ **Puentes de hidrógeno:** los puentes de hidrógeno se forman por la interacción de un grupo -NH (amino) con un grupo -CO (carbonilo) adecuadamente situado [11] (Suarez, 2017).



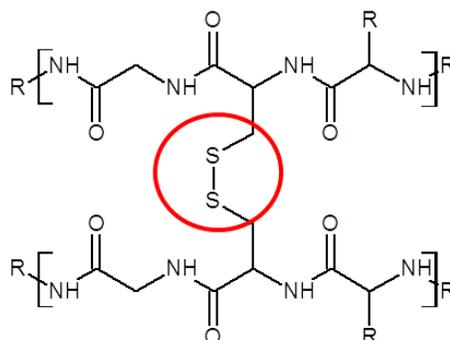
Puentes de hidrógeno en la queratina [11]

- ✓ **Enlaces salinos:** algunas de las cadenas laterales del polipéptido contienen grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) y grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$), existe la posibilidad de la formación de sales orgánicas entre dichos grupos [12], siempre y cuando estén localizados de una manera adecuada (Suárez, 2017).



Puentes salinos en la queratina [12]

- ✓ **Enlaces disulfuro:** la gran solidez e insolubilidad de la queratina en agua se debe a su alto contenido de cistina, la cual mediante un enlace entre los átomos de azufre (S) de este aminoácido; este enlace puede presentarse dentro de una misma cadena de aminoácidos o entre dos cadenas distintas [13] (Wilkinson & Moore, 1990).



Enlaces disulfuro en la queratina [13]

La queratina puede clasificarse en dos grandes familias, en función del tipo y cantidad de aminoácidos presentes, sus tipos de enlace y la forma en la que esta proteína se pliega sobre sí misma, siendo estas:

- **α -Queratina:** se caracteriza por tener un alto contenido de cisteína [7] en su composición, y por consiguiente, son abundantes los enlaces de disulfuro [13] a lo largo de su estructura, lo cual le proporciona rigidez y resistencia (Suarez, 2017). Dichos enlaces causan que la proteína se pliegue sobre sí misma, adquiriendo la forma de una hélice que se tuerce en sentido de las agujas del reloj (dextrógiro) (DeBenedictis & Keten, 2019). Este tipo de queratina se encuentra presente en los mamíferos, siendo el elemento principal del cabello, lana, cuernos, uñas y pezuñas en los mismos (Wang *et al.*, 2015).

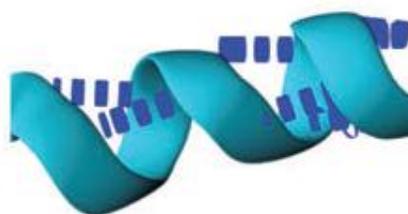


Figura 2. Representación tridimensional de la α -queratina (DeBenedictis & Keten, 2019).

- **β -Queratina:** presenta muy pocas unidades de cisteína [7], siendo en algunos casos inexistente; por esta razón, este tipo de queratina contiene muy pocos enlaces de disulfuro [13] a lo largo de su estructura (Suárez, 2017). Por otro lado, la β -queratina se caracteriza por presentar una mayor cantidad de puentes de hidrógeno en comparación a su contraparte α , esto causa que, en lugar de plegarse sobre sí misma, las cadenas de queratina se pliegan una sobre otra, adquiriendo lo que se conoce como estructura laminar β (DeBenedictis & Keten, 2019). Este tipo de queratina se encuentra presente en las aves y reptiles, formando parte del pico, plumas, escamas y caparzones (Wang *et al.*, 2015).

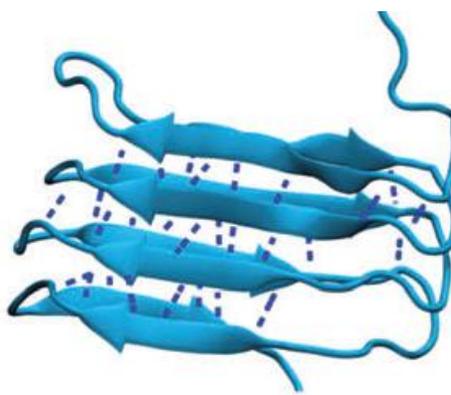
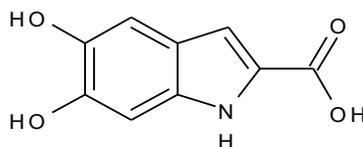


Figura 3. Representación tridimensional de la β -queratina (DeBenedictis y Keten, 2019).

- **Pigmentos:** son los responsables de todas las posibles coloraciones naturales del cabello (negro, castaño, rubio, entre otros). La melanina [14] es el principal pigmento presente en el cabello, pero es necesario recalcar que, este término hace referencia a una amplia familia de compuestos orgánicos (derivados del 5,6-dihidroxiindol), responsables de múltiples funciones biológicas, siendo la más destacable la pigmentación y fotoprotección de la piel, cabello y ojos (Paulin *et al.*, 2021).



Estructura general de las melaninas [14]

1.1.2. Morfología del cabello

El tallo piloso (Figura 4) corresponde al cabello que se puede observar a simple vista; este se compone de α -queratina, y se conforma de tres capas, las cuales, de adentro hacia afuera son las siguientes:

- **Médula:** es la parte más central del cabello. Esta se compone por células queratinizadas con apariencia de esponja, y en el caso de los mamíferos, esta estructura es la responsable de la capacidad para retener el calor y solo es visible en cabellos gruesos (Restrepo, 2010; Granados, 2017; Duverger & Morasso, 2014).
- **Corteza:** es la capa más gruesa del cabello y es la responsable de la fortaleza y coloración del mismo. Se compone de células alargadas con forma de porra, que se disponen en largos filamentos, otorgándole al cabello resistencia a la tracción y al desgaste físico (Restrepo, 2010; Deedrick & Koch, 2004; Schlake, 2007).
- **Cutícula:** constituye la capa más externa del cabello y es responsable de la resistencia ante el desgaste producido por agentes físicos (calor, luz solar, entre otros) y químicos (contaminación ambiental, tintes, decolorantes, entre otros.). Se conforma por células planas, que se apilan una sobre otra, de manera similar a las de las tejas en el techo de una casa (Restrepo, 2010; Yang *et al.*, 2014).

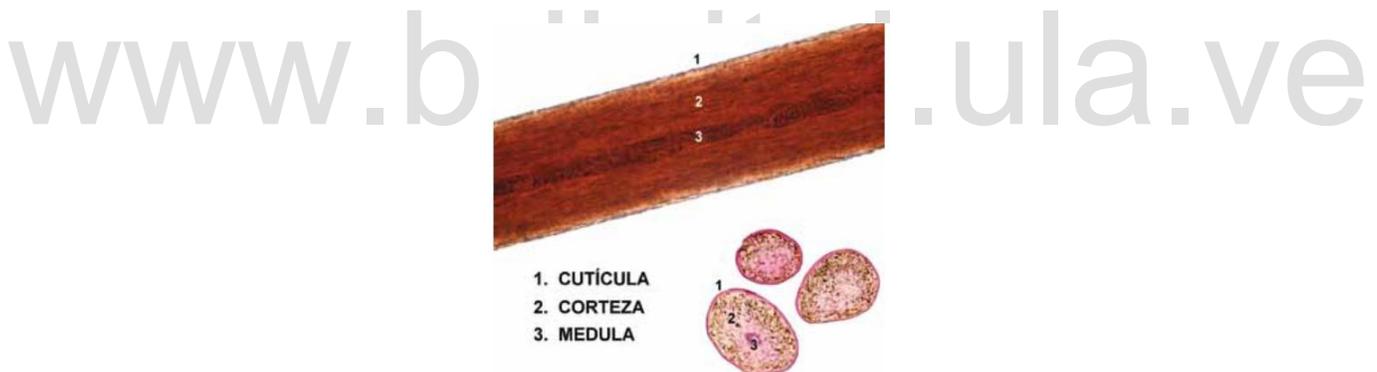


Figura 4. Vista microscópica del cabello. 1) Cutícula. 2) Corteza. 3) Médula (Fuente: Restrepo, 2010).

1.1.3. Ciclo de crecimiento del cabello

La evolución del crecimiento y pérdida del cabello es un evento muy llamativo en los mamíferos, sin embargo, en los seres humanos no existe una muda periódica, por consiguiente, el cabello crece y se cae de manera continua. El desarrollo de este ciclo depende de la interacción de numerosos factores biológicos como las hormonas de crecimiento, neurotransmisores y sus

respectivos receptores (Restrepo, 2010). El ciclo normal de crecimiento del cabello (Figura 5) consta de las siguientes cinco fases:

1. Anágena (A): es la fase más larga del crecimiento activo del cabello y puede durar más de 2 años, la cual puede resultar en cabellos de hasta 80 cm de longitud. Esta etapa da lugar al característico cabello largo y pigmentado. En una persona sana, aproximadamente el 85% de los folículos pilosos se encuentran en esta fase (Restrepo, 2010).
2. Catágena (C): durante esta fase el segmento inferior del folículo retrocede considerablemente, debido a la muerte masiva de las células del folículo piloso, reduciendo así su tamaño. Esta fase dura solamente 2-3 semanas, y por lo tanto solo 3% de los folículos están en esta fase (Restrepo, 2010).
3. Telógena (T): esta dura aproximadamente 100 días, en donde el folículo piloso se encoge hasta la mitad de su tamaño original y adquiere una forma de porra. En esta fase es muy común que ocurra la caída del pelo por tracción (tirón). Aproximadamente el 10-20% de los folículos se encuentran en esta fase (Restrepo, 2010).
4. Exógena (E): en esta fase, los pelos que se encontraban en fase telógena se caen de manera espontánea sin necesidad de tracción (hasta 100 cabellos por día); esto debido al rompimiento de las uniones entre el bulbo piloso (de donde nace el cabello) y la vaina radicular (estructura de la cual se sujeta) del pelo (Restrepo, 2010).
5. Kenógena (K): se refiere al intervalo de tiempo después de la fase exógena en la que el folículo permanece vacío, antes de que salga un nuevo folículo piloso en la fase anágena (Restrepo, 2010).



Figura 5. Fases del ciclo. (A) Anágena, (C) Catágena, (T) Telógena, (E) Exógena y (K) Kenógena (Restrepo, 2010).

1.1.4. Alopecia

Si bien es cierto, que la caída del cabello representa una etapa natural de su ciclo de crecimiento, su pérdida excesiva antes de completar su total desarrollo puede resultar en una severa problemática (Restrepo, 2010).

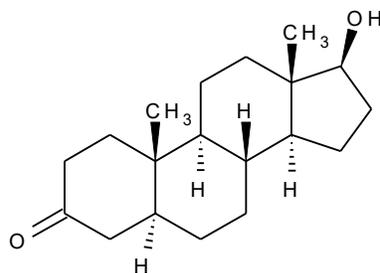
Paradójicamente, a pesar de que el cabello ya no desempeña una función de importancia biológica en los humanos modernos (Zgonc *et al.*, 2020), la pérdida del mismo por causas fisiológicas o patológicas puede presentar severas consecuencias psicológicas en el afectado, ya que el cabello presenta una carga simbólica cultural y social (Restrepo, 2010).

El cuero cabelludo es muy susceptible a diversas patologías (enfermedades), causadas por agentes como virus, hongos y bacterias; esto debido a que es una zona que suele estar en contacto directo con los dedos, instrumentos para el peinado, contaminación, luz solar, calor, humedad, entre otros; las cuales pueden derivar en enfermedades infecciosas (Rajput & Kumar, 2020) o en la pérdida del cabello (Takada *et al.*, 2003).

La alopecia, es el término médico empleado para definir la caída anormal del cabello, siendo esto lo que comúnmente se conoce como calvicie, definiéndose como la pérdida reversible o irreversible de los folículos pilosos, estructura desde la cual nace el cabello, resultando así en una disminución de la densidad capilar de manera difusa (cuando la pérdida es difuminada) o localizada (Gil-Redondo *et al.*, 2019). Estas pueden clasificarse en primarias, cuando se trata de una enfermedad propia del cabello; o secundarias, si son debidas a agentes externos como traumatismos, cirugía, radiación, tumores, entre otras (Gil-Redondo *et al.*, 2019).

A su vez, las alopecias se clasifican en cicatriciales y no cicatriciales. En las primeras, el folículo piloso es destruido totalmente y reemplazado por tejido cicatricial (Cepeda *et al.*, 2014); y las no cicatriciales, las cuales afectan exclusivamente a los folículos sin producirse una atrofia permanente, y por consiguiente, son potencialmente reversibles (curables) (Ferrando & Lacueva, 2000).

Así mismo, las alopecias no cicatriciales más comunes son las areatas (AA) y las androgénicas (AGA), en la primera no se conoce una causa en particular (Juárez *et al.*, 2017); mientras que la segunda es causada por una mayor sensibilidad de los folículos del cuero cabelludo hacia la dihidrotestosterona (DTH) [15] (Linares & Rosales, 2019).

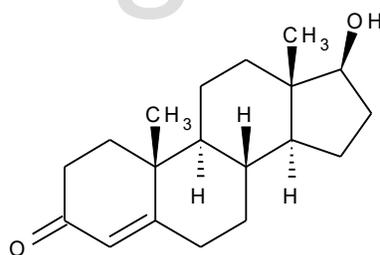


Dihidrotestosterona [15]

1.1.4.1. Alopecia androgénica (AGA)

El AGA es el tipo más frecuente de alopecia, llegando a afectar entre el 70-90% de los hombres a lo largo de su vida y al 50% de las mujeres mayores de 70 años, y en ambos casos, la prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad (Gil-Redondo *et al.*, 2019). Determinando que existen dos factores fundamentales en el desarrollo de esta enfermedad: la genética y la sensibilidad a la dihidrotestosterona [15] sobre los folículos pilosos (Rodríguez, 2017).

Desde el punto de vista fisiológico, cada folículo piloso tiene un mecanismo de control individual dirigido por diversas sustancias como la testosterona [16] y la dihidrotestosterona (DHT) [15] (Rodríguez, 2017). La enzima 5- α reductasa (5aR) es la encargada de metabolizar la testosterona y transformarla en DHT, permitiendo así el desarrollo de los caracteres masculinos, como lo es el desarrollo del vello a nivel general, maduración de los genitales masculinos, entre otros. (Miranda *et al.*, 2019).



Testosterona [16]

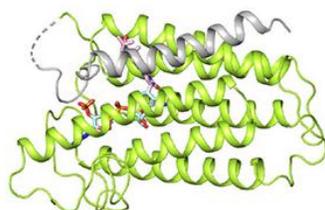


Figura 6. Representación tridimensional de la enzima 5- α -reductasa (5aR) (Xiao *et al.*, 2020).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

En condiciones normales, la testosterona es segregada por las glándulas suprarrenales y por los testículos (en hombres) u ovarios (en mujeres), y pasa al torrente sanguíneo. Posteriormente, la enzima 5- α -reductasa (5aR) presente en la piel, transforma esta hormona en dihidrotestosterona (DTH), la cual se une a los receptores de esta hormona, permitiendo la diferenciación celular del folículo piloso, necesaria para que el ciclo de crecimiento del cabello se lleve a cabo (Borráz-León, 2015).

Sin embargo, en los pacientes de AGA, los folículos pilosos presentan una predisposición genética mayor a la acción de la DTH, lo cual causa una disminución del tamaño en sus estructuras, haciendo que el cabello crezca siendo más corto y delgado, hasta atrofiar el folículo (Miranda *et al.*, 2019; Rodríguez, 2017).

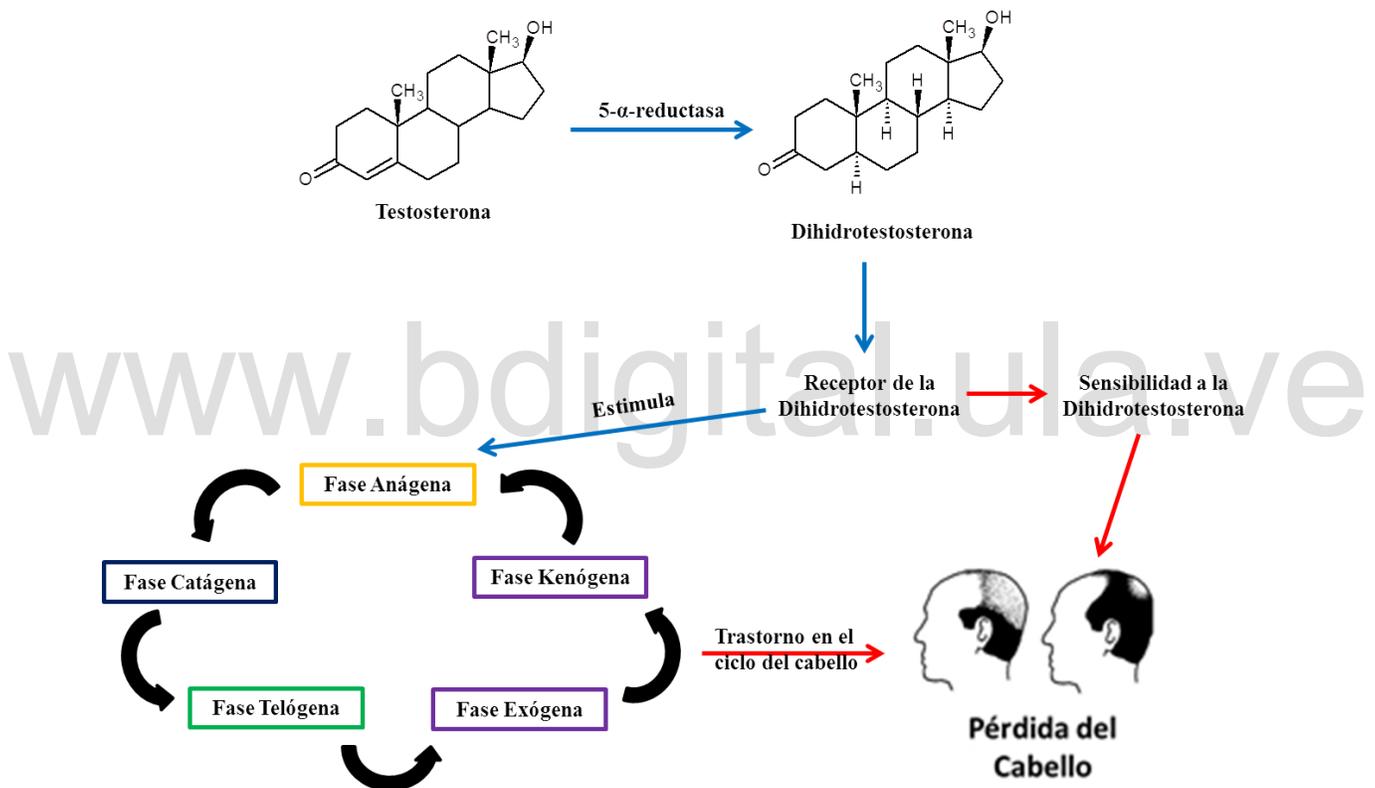


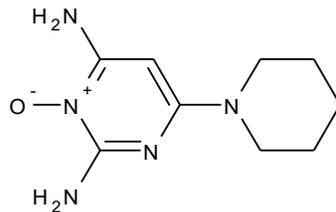
Figura 7. Efecto de la enzima 5- α -reductasa, dihidrotestosterona y testosterona en la pérdida del cabello (Zgonc *et al.*, 2020).

Diversos estudios han demostrado que los hombres con AGA presentan niveles elevados de 5aR y DTH en su piel (Rodríguez, 2017); y de forma contraria, los varones sin calvicie evidencian algún grado de deficiencia de 5aR (Bautista *et al.*, 2014).

1.1.4.2. Fármacos empleados en el tratamiento de la alopecia androgénica

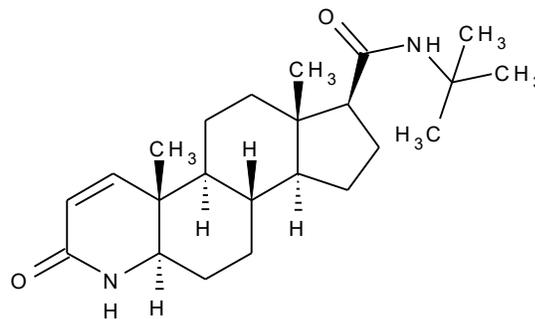
Ahora bien, no es de extrañar que la mayoría de los fármacos empleados para tratar la AGA se enfocan en inhibir la acción de la enzima 5 α R (Figura 7) y así evitar el daño folicular causado por el DTH [15]. Siendo el minoxidil [17] y el finasteride [18] los fármacos más comúnmente empleados en esta patología (Herman & P. Herman, 2017).

Muchas investigaciones aseguran que el minoxidil (2,4-diamino-6-piperidinopirimidina-3-óxido) [17] fue el primer fármaco disponible para el tratamiento de caída del cabello en el cuero cabelludo tanto en hombres como mujeres (Herman & P. Herman, 2017). Este medicamento es aplicado en forma tópica (en solución al 2% o 5%) y debe ser suministrado 2 veces al día por al menos 6 meses (Herman & P. Herman, 2007). Sin embargo, se han reportado importantes efectos adversos relacionados con el minoxidil o su vehículo, tales como: resequeadad del cuero cabelludo, descamación, caspa, irritación local y crecimiento del vello en partes indeseadas (Herman & P. Herman, 2017; Masound *et al.*, 2020).



Minoxidil [17]

Por su parte, el finasteride [18] es otro fármaco utilizado para tratar el AGA, especialmente en hombres, y también en la hiperplasia prostática benigna (Masound *et al.*, 2020). Dicho medicamento debe ser administrado por vía oral, por un periodo mínimo de 1 año (Herman & P. Herman, 2007). Pero, sus efectos adversos son considerablemente más severos que los presentados por el minoxidil, tales como: disminución del libido y volumen de eyaculación, disfunción eréctil, y feminización del feto si es aplicado en mujeres embarazadas (Herman & P. Herman, 2017; Masound *et al.*, 2020).



Finasteride [18]

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Actualmente, las únicas terapias aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de USA (FDA) son el minoxidil [17] tópico y el finasteride [18] por vía oral. Sin embargo, existen otras opciones de fármacos que se pueden emplear como tratamientos primarios o complementarios en otros países (Mark *et al.*, 2021). Pero es necesario acotar que estas alternativas no están exentas de presentar efectos secundarios, en donde, el más común es la disminución del deseo sexual en los hombres (Hipoactividad sexual) (Shen *et al.*, 2018).

En la siguiente tabla se presentan otros tratamientos del AGA y sus efectos secundarios reportados en la bibliografía:

Tabla N°1: Otras drogas empleadas para el tratamiento del AGA, mecanismo de acción y efectos secundarios.

Droga	Mecanismo de Acción	Efectos secundarios	Referencia
Durasterida	Inhibidor de la 5aR.	Disfunción Sexual.	Hirshburg <i>et al.</i> , 2016.
Furidil	Agente Antiandrógeno.	Hipoactividad Sexual.	Sovak <i>et al.</i> , 2002.
Flutamida	Agente Antiandrógeno.	Disfunción Sexual y Hepatosis.	Hamishehkar <i>et al.</i> , 2016.
Espiro lactona	Agente Antiandrógeno.	Ginecomastia.	LaLone <i>et al.</i> , 2013.
Acetato de Ciproterona	Antagonista AR.	Hipoactividad Sexual.	Mallari <i>et al.</i> , 2002.
Ketoconazol	Agente Antiandrógeno.	Hipoactividad Sexual.	Sugar <i>et al.</i> , 1987.
Tofacitinib	Inhibidor de la JAK.	Infecciones.	Scheinberg <i>et al.</i> , 2017.

(Shen *et al.*, 2018).

Además, la suspensión de cualquiera de estos fármacos puede resultar en un grado de alopecia mayor que al inicio del tratamiento. Debido a esto, las terapias con drogas sintéticas se han vuelto cuestionables debido a su falta de eficacia, seguridad y sus posibles efectos adversos. Aumentando así el interés en tratamientos alternativos con menos efectos secundarios, tales como las formulaciones que contienen hierbas y/o sus principios activos (Herman & P. Herman, 2017).

1.1.4.3. Productos naturales en el tratamiento de la alopecia androgénica

Se encuentran numerosas plantas cuyos extractos presentan la capacidad de estimular el crecimiento del cabello y prevenir la caída del mismo: Si bien es cierto que no se conoce del todo

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

el mecanismo de acción de dichas sustancias, se cree que el crecimiento del cabello se da como consecuencia del aumento del flujo sanguíneo, activación de las papilas dérmicas y la inhibición del DTH, 5aR y la inflamación en los folículos (Shen *et al.*, 2018).

En la siguiente tabla se enumeran algunas plantas que se presentan como un tratamiento potencial para estimular el crecimiento del cabello:

Tabla N°2: Extractos de algunas plantas con potencial de crecimiento del cabello.

Extracto	Nombre Botánico	Observación	Efecto	Referencia
Extracto de éter de petróleo o etanol.	<i>Cuscuta reflexa</i>	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Promueve el crecimiento del cabello. Aumenta los niveles de testosterona.	(Patel <i>et al.</i> , 2014)
Extracto de metanol	<i>Eclipta alba</i>	<i>In vivo</i>	Promueve el crecimiento del cabello.	(Datta <i>et al.</i> , 2009).
Extracto de éter de petróleo	<i>Eclipta alba</i>	<i>In vivo</i>	Promueve la proliferación de HaCaT.	(Begum <i>et al.</i> , 2015).
Extracto de metanol	“Fructus” <i>Panax ginseng</i>	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Promueve el crecimiento del cabello.	(Park <i>et al.</i> , 2011).
Aceite esencial.	<i>Zizyphus jujuba</i>	<i>In vivo</i>	Promueve el crecimiento del cabello.	(Yoon <i>et al.</i> , 2010).
Extracto acuoso.	<i>Aconite ciliare</i>	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Promueve el crecimiento del cabello.	(Park <i>et al.</i> , 2012).
Extracto de etanol al 70%	<i>Panax ginseng</i>	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Promueve el crecimiento de los folículos humanos.	(Lee <i>et al.</i> , 2017).
Aceite esencial	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	<i>In vivo</i>	Promueve el crecimiento del cabello.	(Park <i>et al.</i> , 2013).
Extracto en etanol al 50%	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Promueve el crecimiento del cabello.	(Murata <i>et al.</i> , 2013).

(Shen *et al.*, 2018).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

1.2.Champú

Posiblemente el producto más empleado para el cuidado del cabello es el champú, producto cosmético que se utiliza con el fin de remover la suciedad, grasa producida por las glándulas sebáceas y las células muertas de la piel. El origen de la palabra champú deriva del hindú “*chāmpnā*”, término que se emplea para referirse a los masajes realizados en el cuero cabelludo con aceites o lociones, por lo tanto, su nombre no hace referencia como tal al producto en sí, sino a su forma de aplicación (Figuroa *et al.*, 2013).

El uso de este producto es relativamente reciente, sin embargo, las primeras referencias que se pueden encontrar sobre su origen datan del antiguo Egipto, en donde las personas lavaban su cabello y cuero cabelludo con una mezcla de agua y jugo de limón, el cual debido a su carácter ácido descompone la grasa de manera eficiente. Posteriormente, en la Edad Media, apareció una alternativa muy similar al champú actual, la cual consistía en hervir jabón con agua y sosa cáustica (Baquero, 2019).

1.2.1. Componentes del champú

En la actualidad, los champús se constituyen de una mezcla de sustancias escogidas en función de los requerimientos seleccionados por el formulador; pero de manera general, los componentes de un champú se pueden clasificar de la siguiente manera:

1.2.1.1.Tensoactivos o surfactantes:

Son sustancias que tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial de un líquido (Herrera, 2017). Esta capacidad está íntimamente relacionada con su estructura molecular, en la que se pueden distinguir dos partes: una hidrófila (polar), que es soluble en agua y otros disolventes polares, y otra parte lipofílica (apolar), soluble en grasas y solventes no polares. De esta manera, las moléculas se orientan de manera espontánea en las interfaces agua-aceite, formando una fina película interfacial que altera en gran medida las propiedades del solvente (Salager, 1988).

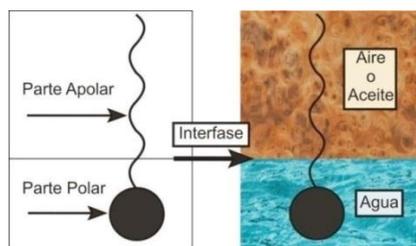
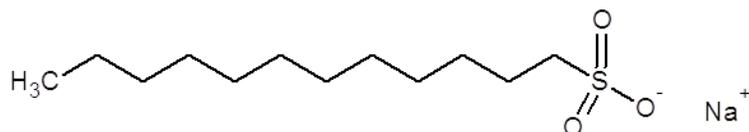


Figura 8. Acomodo de un tensoactivo en una interfaz agua-aceite (Salager, 1988).

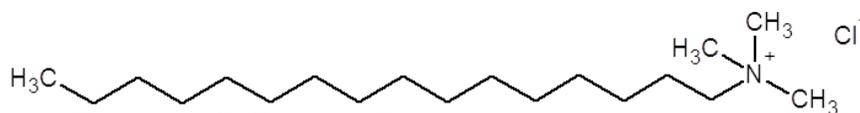
A su vez, los tensoactivos se pueden clasificar en tres grupos:

- 1) **Aniónicos:** son ampliamente empleados en los productos de aseo personal. Sin embargo, presentan el inconveniente de no ser compatibles con los surfactantes catiónicos y de precipitar en presencia de cationes divalentes. Un ejemplo de estos es dodecil sulfato de sodio [19], el cual es comúnmente usado en la formulación del champú (Salinas & Molina, 2021).



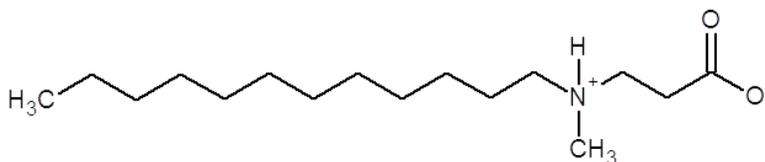
Dodecil sulfato de sodio [19]

- 2) **Catiónicos:** los más usados son las sales de amonio cuaternario y las sales de aminas, por ser menos sensibles a los cambios de pH. Usualmente se emplean por sus propiedades bactericidas, antisépticas y enjuagantes. Un ejemplo de estos es cloruro de cetil trimetil amonio [20] (Salinas & Molina, 2021).



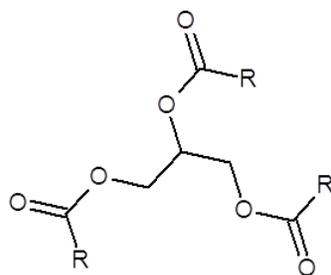
Cloruro de cetil trimetil amonio [20]

- 3) **Anfóteros:** son capaces de actuar como surfactantes aniónicos, catiónicos o no iónicos según el pH del medio. Se emplean a su vez como agentes detergentes y bactericidas. Ejemplos de estos son los derivados de la betaína [21] (Salinas & Molina, 2021).



β -Aminoácido derivado de la betaína [21]

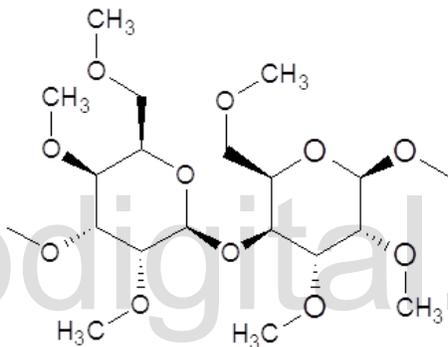
- 4) **No iónicos:** Presentan la ventaja de ser compatibles como otros surfactantes y ser pocos sensibles a los cambios de pH. Además, se emplean como detergentes y emulsificantes. Ejemplos de estos son los ésteres de glicerol [22] (Salinas & Molina, 2021).



Ésteres derivados del glicerol [22]

1.2.1.2.Viscosantes

Permiten regular la consistencia y propiedades de flujo de un líquido, además de facilitar su aplicación. Usualmente se usan coloides hidrofílicos (metil celulosa) [24] (Herrera, 2017).



Metilcelulosa [24]

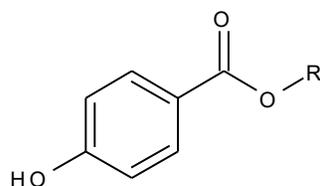
1.2.1.3.Colorantes y fragancias

Se emplean con la finalidad de aportar al producto propiedades organolépticas (color y olor), haciendo que este sea más agradable a la vista del consumidor (Herrera, 2017).

1.2.1.4.Conservantes

Ejercen una función antimicrobiana y bactericida, lo cual prolonga su vida en el anaquel. Ejemplo de estos son los parabenos [25] (Herrera, 2017).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU



Estructura general de los parabenos [25]

1.2.1.5. Aditivos

Son componentes de diversa naturaleza química: aceites, hidrolatos, extractos, sustancias de origen vegetal, entre otros. Los cuales infieren al producto diversas propiedades de interés (estéticas o farmacológicas), según los requerimientos del formulador (Herrera, 2017).

1.2.2. Proporción de los componentes en el champú

Tabla N°3: Proporciones genéricas de los componentes presentes en el champú.

Componentes	% (m/m) :
Tensoactivos	1-11
Suavizantes	5-5,5
Colorantes	0,01-0,02
Conservantes	0,1-1
Aditivos	0,1-5
Viscosantes	0,3-1
Reguladores de pH	0-1 (variable)
Fragancias	0,5
Agua Destilada	50-65

(Samaniego & Fuertes, 2017).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

1.3.Tónico capilar

Es un tipo de preparado farmacéutico líquido y de uso dermatológico, que está constituido de un vehículo (solvente) y de uno o varios componentes con las propiedades farmacológicas deseadas (antipruriginoso, antiséptico, secante, promotor del crecimiento capilar, entre otros). (Maurtua & Zuguiña, 2018).

Las formas farmacéuticas en las que se presentan los tónicos capilares pueden ser soluciones o suspensiones alcohólicas, hidroalcohólicas, acuosas o hidroglicólicas. La elección del vehículo dependerá, en mayor medida, de la solubilidad del principio activo y del objetivo de la formulación preparada (Silva & Santos, 2021).

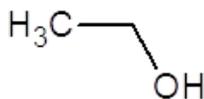
1.3.1. Componentes del tónico capilar

1.3.1.1.Sustancias activas

Son compuestos químicos que pueden presentar diversas propiedades: antiseborreica, antialopécica, antipitiriásica, entre otros. Una única sustancia puede presentar uno o varios efectos farmacológicos deseados, a pesar de que su mecanismo de acción no esté del todo esclarecido. Si bien es cierto que existen diversas formulaciones cuyo efecto se conoce, el médico, en conjunto con el formulador, pueden ajustar la proporción del principio activo para cada caso en particular (Maurtua & Zuguiña, 2018).

1.3.1.2.Vehículos

Los vehículos más empleados son las mezclas, en diversas proporciones, de agua y etanol. Esto se debe a que el agua, por si sola, es poco humectante y penetrante; pero el etanol es un solvente más cómodo debido a que la gran mayoría de los compuestos orgánicos son solubles en este medio, además, presenta una acción penetrante y antiséptica. Usualmente se emplea etanol [26] de graduación alta 80-95°, que con el agregado de agua se disuelve hasta grados alcohólicos inferiores a 50°. (Maurtua & Zuguiña, 2018).



Etanol [26]

1.3.1.3.Emolientes

Tienen como función remediar la resequeidad causada por el vehículo hidroalcohólico, evitando así la resequeidad del cuero cabelludo. Estas sustancias emolientes pueden ser: glicerina, propilenglicol, miristato de isopropilo; y en menor proporción, lecitina y grasas o aceites vegetales (Maurtua & Zuguiña, 2018).

Sin embargo, al agregar un emoliente a una solución alcohólica sin agua, no se impide la acción reseicante de la misma; razón por la cual las lociones deben ser formuladas con la cantidad de agua suficiente para evitar la deshidratación cutánea, y la cantidad adecuada de emolientes para lubricar la epidermis y restaurar las grasas naturales, que han sido removidas por la acción del vehículo (Maurtua & Zuguiña, 2018).

1.3.1.4.Colorantes y fragancias

El aspecto es una de las características más importantes de los productos cosméticos, razón por la cual es común el uso de diversas sustancias que provean al producto de propiedades organolépticas (olor, color, entre otros.), con lo cual los hacen más agradables ante el consumidor (Maurtua & Zuguiña, 2018).

1.3.2. Proporción de los componentes en los tónicos capilares

Tabla N°4: Proporciones genéricas de los componentes presentes en los tónicos capilares.

Componente:	% (m/m) :
Sustancias Activas	0,1-5
Emolientes	1-10
Colorantes	0,1-0,5
Perfumes	0,1-1
Agua Destilada	15-20
Etanol	50-75

(Maurtua & Zuguiña, 2018).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

1.4. Romero (*Rosmarinus officinalis*)

1.4.1. Clasificación taxonómica

Tabla N°5: Taxonomía del romero.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Tribu	Mentheae
Género	<i>Rosmarinus</i>
Especie	<i>Rosmarinus officinalis</i>

(Mardones, 2014).

1.4.2. Descripción botánica

Arbusto aromático, siempre verde, de hasta 1,2 m de alto, tallo recto, ramas numerosas, corteza exfoliante, finamente puberulenta, hojas sésiles, opuestas, verdes, numerosas, lanosas, obtusas, glandulares, de 1-3 cm de largo, casi cilíndricas y dobladas hacia adentro. Flores fragantes, de 10-12 mm de largo en pequeños grupos terminales, cáliz tubulado, corola bilabiada de color violeta, estilo alargado, fruto ovalado dividido en cuatro secciones (Fuentes & Montes, 2019; Andrade *et al.*, 2018).



Figura 9. *Rosmarinus officinalis*. A) Arbusto. B) Hojas. C) Corteza. D) Flores E) Semillas. F) Ramas. (<https://identify.plantnet.org/es/the-plant-list/species/Rosmarinus%20officinalis%20L./data.>)

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

1.4.3. Hábitat

Es nativo de la cuenca mediterránea del sur de Europa, hasta 1.500 msnm en lugares abrigados; se cultiva comercialmente en Europa y Norte América en climas templados y templado-cálidos. Introducido en Latinoamérica en climas templados y secos de alturas variables (Andrade *et al.*, 2018).

1.4.4. Fitoquímica y actividad biológica

La *Rosmarinus officinalis* presenta una gran cantidad de compuestos con actividad biológica, entre los cuales destacan diversos tipos de monoterpenos, diterpenos y polifenoles; dichos componentes pueden obtenerse, en mayor o menor proporción, mediante distintas técnicas de extracción como la destilación por arrastre de vapor, maceración, extracción sólido-líquido en Soxhlet, ultrasonido, entre otros (Gonzales *et al.*, 2020).

Sin embargo, la composición de moléculas bioactivas de estos extractos puede variar en función del origen geográfico de la planta, la parte empleada, la etapa de desarrollo durante la cosecha, el tipo de material utilizado (hojas frescas, hojas secas, flores, entre otros), y evidentemente, el tipo de extracción (Gonzales *et al.*, 2020).

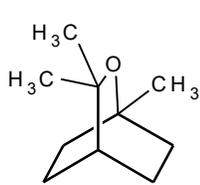
Tabla N°6: Principales moléculas bioactivas del romero (*Rosmarinus officinalis*).

Principales monoterpenos	1,8-cineol (eucaliptol) [27], alcanfor [28], α -pineno [29], borneol [30], verbenona [31], limoneno [32] y β -carofileno [33].
Principales diterpenos	Ácido carnósico [34], carnosol [35], rosmarol [36], epirosmarol [37], isorosmarol [38] y rosmaridifenol [39].
Principales triterpenos	Ácido oleanólico [40], ácido ursólico [41], betulina [42], α -amirina [43] y β -amirina [44].
Flavonoides	Luteolina [45], apigeina [46], genkwanina [47], diosmetina [48], hispidulina [49] y 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona [50].
Ácidos fenólicos	Ácido cafeico [51], ácido clorogénico [52] y ácido rosmarínico [53].

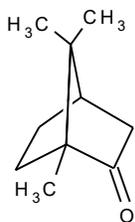
(Gonzales *et al.*, 2020).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

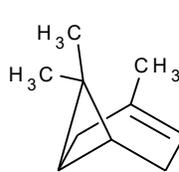
Robert Aljorna



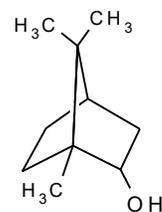
1,8-cineol [27]



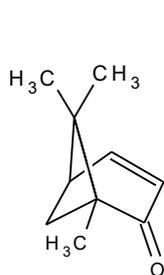
Alcanfor [28]



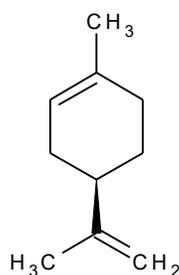
α-pineno [29]



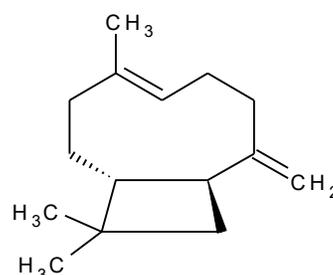
Borneol [30]



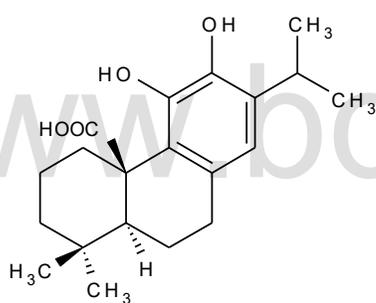
Verbenona [31]



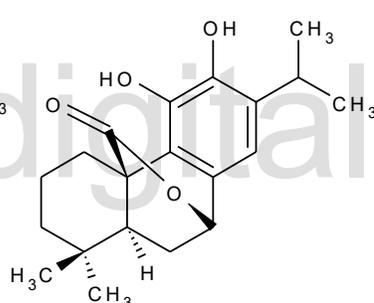
Limoneno [32]



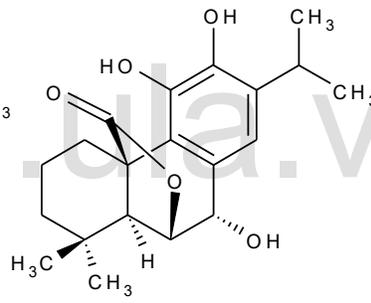
β-carofileno [33]



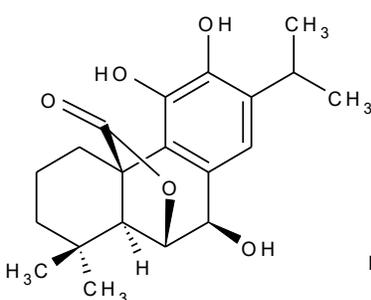
Ácido carnósico [34]



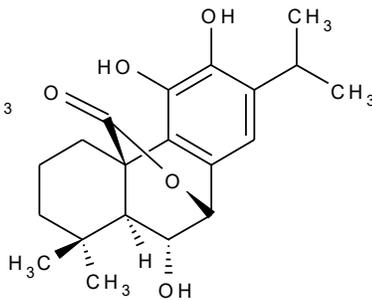
Carnosol [35]



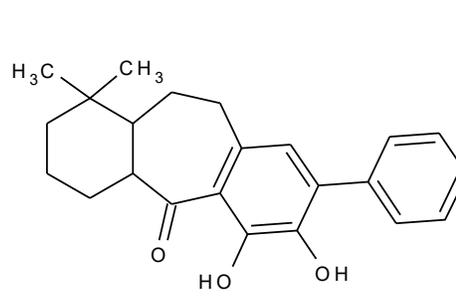
Rosmarol [36]



Epirosmarol [37]



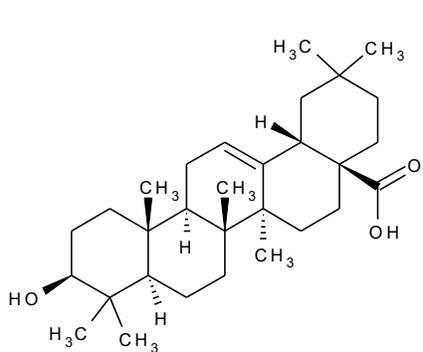
Isorosmarol [38]



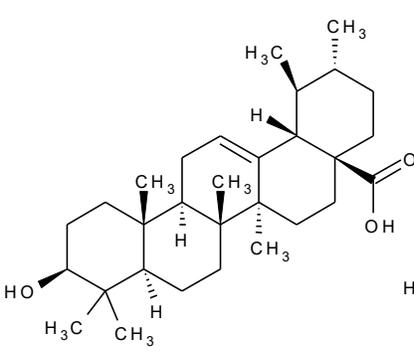
Rosmaridifenol [39]

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

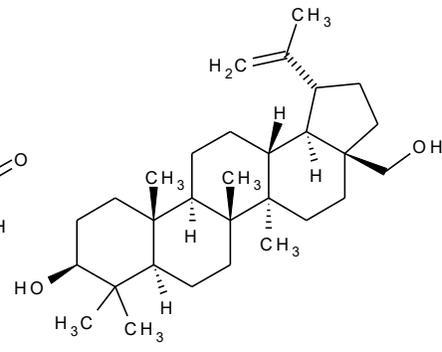
Robert Aljorna



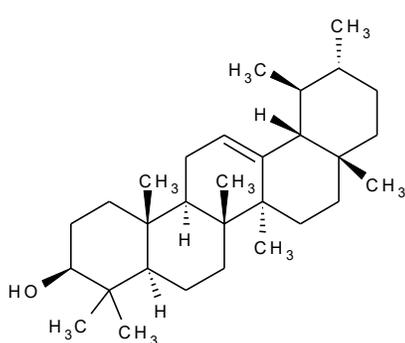
Ácido oleanólico [40]



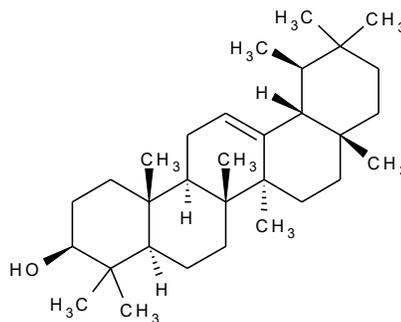
Ácido ursólico [41]



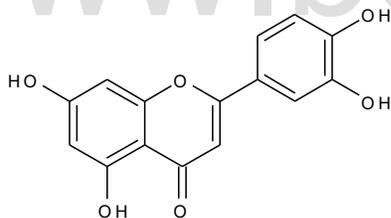
Betulina [42]



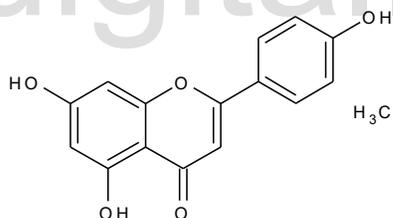
α-amirina [43]



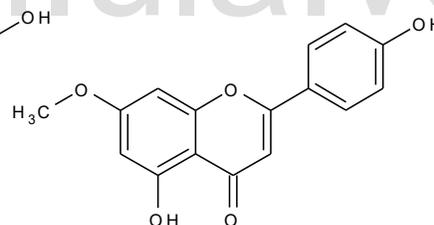
β-amirina [44]



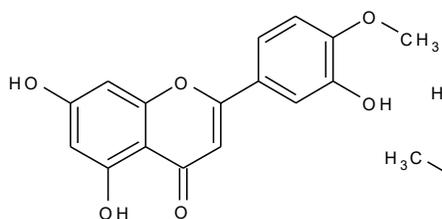
Luteolina [45]



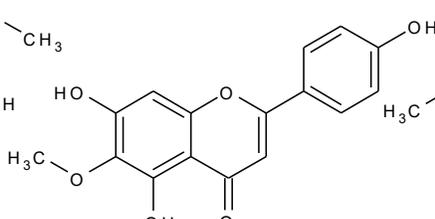
Apigeina [46]



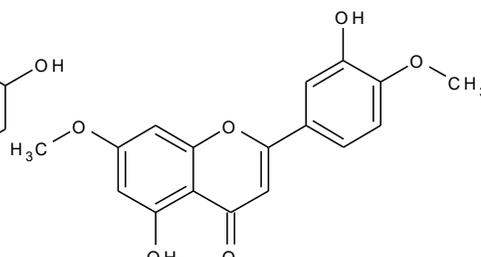
Genkwanina [47]



Diosmetina [48]



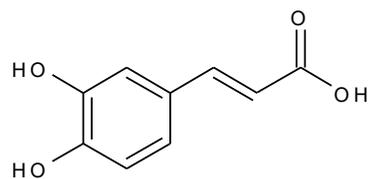
Hispidulina [49]



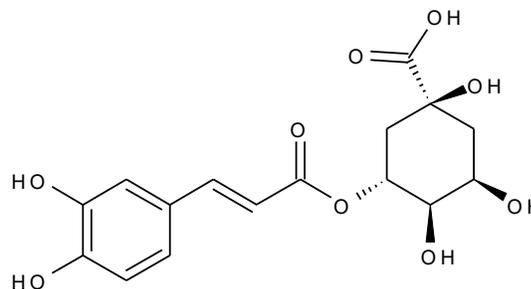
5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona [50]

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

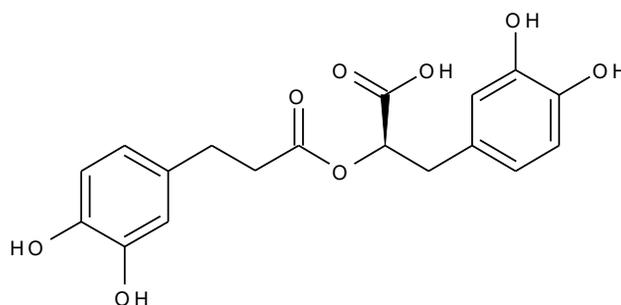
Robert Aljorna



Ácido cafeico [51]



Ácido clorogénico [52]



Ácido rosmarínico [53]

Una de las principales características de los extractos de romero es su capacidad de actuar como un agente antioxidante (Barve & Dighe, 2016), debido a la presencia de los diterpenos fenólicos carnosol [35] y ácido carnósico [34] (Fiume, 2013). Dicha capacidad antioxidante ha demostrado ser de utilidad para prevenir y reparar el cabello sometido a tratamientos oxidativos y/o reductores (Takada *et al.*, 2003; de Macedo *et al.*, 2020).

1.4.5. Usos medicinales

Las hojas maceradas en etanol se usan de manera tópica para irritaciones cutáneas (Maurtua & Zuguiña, 2018.), evitar la caída del cabello (Tigist *et al.*, 2016) y promover su crecimiento (Murata, 2013).

La infusión de sus hojas se emplea, en forma de tratamiento oral, para la amigdalitis, anemia, bronquitis, cefalea, cólicos, debilidad, depresión, desórdenes circulatorios, diarrea, dolores diversos, edema, hipotensión arterial, indigestión, influenza, vómitos, náuseas, parasitismo, tos y vértigo (Ávila-Sosa *et al.*, 2011).

A toda la planta se le atribuyen propiedades antioxidantes (Takada *et al.*, 2003), antiséptica, aperitiva, astringente, carminativa, digestiva, espasmolítica, insecticida, sedante y tónica (Ávila-Sosa *et al.*, 2011).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Las ramas secas y frescas se caracterizan por ser aromatizantes, razón por la cual se usan en arreglos florales, platillos, bouquet, entre otros. Además, se suele sembrar de manera ornamental y para colorear la lana con tonalidades verde-amarillo (Maurtua & Zuguiña, 2018.).

En el caso de los preparados cosméticos, los productos derivados del *Rosmarinus officinalis* se emplean con la finalidad de aportar acondicionamiento a la piel y al cabello o proporcionar fragancia al producto (Fiume, 2013). En este trabajo también se recalca, que la mayoría de las formulaciones cosméticas contienen concentraciones muy bajas de ingredientes derivados de *Rosmarinus officinalis* (romero), a menudo menos del 5% (Fiume, 2013).

1.4.6. Uso de la *Rosmarinus officinalis* (romero) en el tratamiento de la alopecia androgénica

Algunos estudios “*in vitro*” señalan, que la capacidad antiandrogénica de los extractos de romero se debe a que uno de sus componentes, el ácido 12-metoxicarnósico, exhibe la propiedad de inhibir la acción de la enzima 5aR, y por consiguiente se reduce en gran medida la transformación de la testosterona en DHT, evitando así la atrofia de los folículos pilosos (de Macedo *et al.*, 2020; Murata *et al.*, 2013).

En el año 2013, se realizó un estudio “*in vivo*” en donde se evaluó la capacidad inhibidora de la enzima 5aR del extracto alcohólico del *Rosmarinus officinalis* (RO-ext) en ratones, cuyo crecimiento capilar fue interrumpido por tratamiento con testosterona; dicho extracto se aplicó de forma tópica en una dosis de 2 mg de extracto/día por un periodo 16 días. En este ensayo se evidenció que el RO-ext modifica la acción de la enzima hasta un 94,6%, traducándose en una mejoría en el crecimiento del cabello en los ratones tratados con éste. Con ello se concluye que el RO-ext es un prometedor candidato para el tratamiento del AGA (Murata *et al.*, 2013).

El extracto de dicha investigación se obtuvo mediante extracción de las hojas de la planta con una solución acuosa de etanol al 50%, en un sistema de reflujo, por un periodo de 2 horas; posteriormente el extracto se filtró y evaporó a presión reducida, obteniéndose un rendimiento del 25% (Murata *et al.*, 2013).

En paralelo a los ensayos con ratones, también existen ensayos clínicos en humanos en donde comparan el efecto androgénico del extracto de *Rosmarinus officinalis* de manera individual (Barikbin *et al.*, 2014) o de manera combinada con otras hierbas (Masound *et al.*, 2020), con respecto a la aplicación de minoxidil al 5%. En ambos se usaron voluntarios del sexo masculino diagnosticados con AGA, previamente. Los dos estudios demostraron una mejoría en el crecimiento del cabello en los participantes que emplearon el extracto de la planta (Barikbin *et al.*, 2014) o una combinación del mismo con el minoxidil (Masound *et al.*, 2020); además en ambos grupos, la mayoría de los participantes se sentían significativamente satisfechos con los resultados (Masound *et al.*, 2020; Barikbin *et al.*, 2014). Siendo otro punto a favor, que al finalizar el estudio, ninguno de los participantes demostró alteración hormonal ni efectos secundarios (Barikbin *et al.*, 2014).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU



Figura 10. Fotografías globales de los pacientes del grupo MTS+THS (minoxidil al 5% + extracto de *Rosmarinus officinalis*) MTS (extracto de *Rosmarinus officinalis*) al inicio del tratamiento y a la semana 36 (Masound *et al.*, 2020).

Debido a la alta eficacia que han demostrado los extractos de *Rosmarinus officinalis*, no es sorprendente que diversas empresas se muestren dispuestas a introducirlos como aditivos en sus preparaciones cosméticas, especialmente en champús, con el fin de prevenir y tratar el daño en el cabello causado por la vida diaria (Takada *et al.*, 2003), o promover el crecimiento del cabello en los pacientes con AGA (Masound *et al.*, 2020; Barikbin *et al.*, 2014).

1.4.7. Aceite esencial de romero

Este término hace referencia a una mezcla muy compleja de compuestos volátiles, caracterizados por su potente olor, que son sintetizados por diversos órganos en las distintas partes de la planta, las cuales presentan múltiples funciones biológicas y ecológicas; el aceite se obtiene mediante destilación por arrastre de vapor. Por otro lado, debido a sus propiedades intrínsecas, el aceite esencial de romero es ampliamente empleado como conservante alimenticio, en aromaterapia, y en la preparación de fragancias y demás productos cosméticos (Teixeira *et al.*, 2013; Kadriet *et al.*, 2011).

El aceite esencial de romero se presenta en forma de un líquido incoloro o amarillo pálido, el cual presenta un olor característico a romero, y químicamente hablando, está constituido principalmente de monoterpenoides, como el 1,8-cineol [27], alcanfor [28] y α -pineno [29] (Rašković-*et al.*, 2014).

1.4.8. Hidrolato de romero

Los hidrolatos, también conocidos como hidrosoles o aguas aromáticas, son la fase acuosa obtenida de la destilación por arrastre de vapor de diferentes partes de una planta aromática, la cual se separa de la fase oleosa (aceite esencial) al finalizar dicho proceso. Estos suelen emplearse en la gastronomía y en la fabricación de fragancias y cosméticos (Politiet *et al.*, 2022).

Si bien es cierto que, existen muy pocos estudios sobre la composición química de los hidrolatos, en comparación con sus aceites esenciales, diversos estudios afirman que su composición en cuanto a metabolitos secundarios, difiere en un 40% entre ambos. En el caso del hidrolato de romero, su constitución se compone, en mayor parte, de 1,8-cineol [27], alcanfor [28] y verbenona [31]. Sin embargo, sus cantidades relativas pueden diferir considerablemente debido a distintos factores; clima, subespecie, fertilizantes, entre otros (Politiet *et al.*, 2022).

1.4.9. Extracto alcohólico de romero

Los extractos herbales, o también conocidos como tinturas, son un preparado que se obtiene mediante la extracción sólido-líquido de una planta (o cualquiera de sus partes), empleando un solvente polar, siendo el más común el etanol [26]. Dicha extracción puede llevarse a cabo mediante distintas técnicas: maceración, ultrasonido, microondas, reflujo, Soxhlet, entre otros (Quezada *et al.*, 2021).

Es bien sabido que el extracto alcohólico de romero, presenta diversas propiedades farmacológicas, entre las que resaltan: antienvjecimiento, hepatoprotectoras, anticonceptivas, antioxidantes y antidepresivas (Amaral *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista fitoquímico, el extracto de romero se conforma de una amplia variedad de metabolitos, como los son los alcaloides, flavonoides, y terpenoides. En donde, los compuestos mayoritarios son el carnosol [35], ácido carnósico [34], ácido rosmarínico [53], ácido ursólico [41] y ácido caféico [51]; los cuales se creen que son los responsables, en mayor medida, de la actividad biológica del romero y su combinación es capaz de generar una sinergia eficaz ante distintas patologías (Einbond *et al.*, 2012).

1.4.10. Extracción de productos naturales

Los productos naturales son todas aquellas moléculas, de carácter orgánico, que son sintetizadas por la Naturaleza. Dichas moléculas son los pilares fundamentales de todos los seres vivos (animales, plantas, hongos y microorganismos), y abarcan un enorme abanico de especies químicas: proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, aminoácidos, alcaloides, derivados fenólicos, terpenoides, entre otros. Y muchos de estos compuestos son de gran interés industrial, farmacéutico y cosmético (Ringuelet & Viña, 2013).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

La extracción, es una de las operaciones más básicas que se pueden realizar dentro de un laboratorio. Esta técnica consiste en la separación, mediante un líquido, de uno o varios compuestos de interés de una muestra (Núñez, 2010). El tipo de extracción empleada, depende en mayor medida de la naturaleza del material de origen y de las propiedades químicas de las sustancias que se pretenden aislar (Sampayo, 2015).

En este proceso, la elección del solvente a emplear es de vital importancia, ya que en función de éste, se puede obtener un extracto que contenga la mayor parte de los constituyentes químicos de la especie vegetal; o por otro lado, un extracto que solo contenga compuestos químicos con una propiedad particular. Por ejemplo, en el primer caso, se optaría por un solvente con una polaridad elevada, mientras que para el segundo caso, se suele elegir un solvente de baja o media polaridad (Sampayo, 2015).

De manera general, un proceso de extracción para especies vegetales, incorpora las siguientes etapas (Sarker *et al.*, 2006):

- 1) Secado y molienda del material vegetal, para homogeneizar las partes frescas de la planta (hojas, tallos, flores, entre otras).
- 2) Elección del disolvente, pudiendo ser una extracción polar (agua, metanol o etanol), de polaridad media (acetato de etilo) o no polar (hexano, éter de petróleo y cloroformo).
- 3) Elección del método de extracción (maceración, reflujo, microondas, entre otros).

1.4.10.1. Variables en un proceso extractivo

Las variables que afectan a cualquier operación de extracción, son de gran interés experimental, ya que éstas permiten establecer con antelación, el método más adecuado de extracción a llevar a cabo, en función de las propiedades físicas y químicas de las sustancias a aislar, los equipos y solventes a emplear, entre otros (Sampayo, 2015). Siendo estas variables, las siguientes:

- Estado de División: la eficiencia de un proceso extractivo será mayor cuando el tamaño de la partícula sea más pequeño, ya que así se logra una mayor superficie de contacto del material vegetal con el solvente. Sin embargo, el uso de partículas muy finas puede conllevar a necesitar etapas adicionales de filtración especiales, con el fin de separarlas eficazmente del extracto obtenido (Sampayo, 2015).
- Agitación: gran parte de la eficiencia de un proceso extractivo está en función del equilibrio de saturación del disolvente. La agitación constante hace que nuevas cantidades de disolvente entren en contacto con el material, de manera que un nuevo equilibrio sea alcanzado. El movimiento del líquido, desplaza el equilibrio aumentando la eficiencia del proceso (Sampayo, 2015).

- Temperatura: la disolución de las sustancias es facilitada con el aumento de la temperatura, que contribuye al desplazamiento del equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia de la extracción. Sin embargo, muchos productos naturales son propensos a presentar descomposición térmica y pueden ser destruidos, parcial o totalmente, a temperaturas elevadas (Sampayo, 2015).
- pH: la solubilidad de distintas sustancias puede depender del pH del disolvente, ya que permite la formación de sales orgánicas, que en la mayoría de los casos, son solubles en agua (Sampayo, 2015).
- Naturaleza del Solvente: dependiendo de la finalidad deseada, el disolvente empleado puede extraer, de manera selectiva o no, ciertas clases de compuestos. Dicha propiedad depende, en gran medida, de la polaridad del disolvente (Sampayo, 2015).
- Tiempo de Extracción: se determina en función del disolvente y los equipos empleados. Esta variable es resultante de las variables anteriormente explicadas. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la extracción de los compuestos de interés (Sampayo, 2015).

1.4.10.2. Métodos de extracción de productos naturales

Es importante recalcar que la elección del método de extracción depende, en gran medida, de la naturaleza de la matriz de la muestra y de los compuestos de interés. Por ejemplo, un compuesto térmicamente estable y soluble en solventes polares, puede ser extraído mediante múltiples técnicas, y la elección de la misma puede depender del criterio del operador y los equipos que este tenga a su disposición. Por otro lado, un compuesto que presenta descomposición térmica y solo es soluble en compuestos apolares, presentará un abanico menos variado, en cuanto a métodos de extracción se refiere (Martínez, 2020). Entre los métodos de extracción más empleados se tienen:

- Maceración: es una de las técnicas empleadas más simples, y consiste en dejar el producto natural, triturado o finamente molido, en un recipiente con un disolvente afín a los productos de interés, a temperatura ambiente y con agitación constante u ocasional (Ampayo, 2015).

Posteriormente, el material vegetal debe ser separado del disolvente, generalmente mediante filtración o centrifugación. Es común que este proceso se repita varias veces, cambiando el disolvente en cada proceso (Ampayo, 2015).

- Extracción en soxhlet: utiliza un sistema de evaporación y condensación continua sobre una muestra seca, generalmente triturada o molida previamente. Es empleado en una gran cantidad de matrices orgánicas, especialmente en la extracción de lípidos. Su

principal ventaja es que permite realizar extracciones exhaustivas de las sustancias de interés, a la temperatura de ebullición de los solventes empleados (Martínez, 2020).

El extractor Soxhlet (Figura 11.), consiste en un sistema conformado por un balón que contiene el disolvente, el cual se evapora hasta llegar a un condensador de reflujo. Luego, el disolvente se condensa sobre un cartucho de material poroso que contiene a la muestra a extraer, y éste arrastra consigo los compuestos de interés hasta el balón nuevamente. Finalmente, este proceso se repite múltiples veces hasta que la extracción de la muestra se agote (Ampayo, 2015).

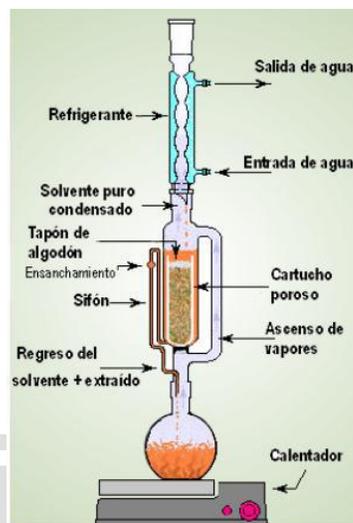


Figura 11. Esquema de un extractor Soxhlet.

- Extracción asistida por ultrasonido: consiste en emplear ondas ultrasónicas, en conjunto con agitación mecánica, para facilitar el proceso de disolución de las sustancias de interés en el solvente. Esta técnica tiene como principal ventaja, su utilidad para tratar grandes cantidades de muestra con un menor volumen de disolvente. Sin embargo, requiere de grandes tiempos de extracción y de procesos adicionales de filtración (Martínez, 2020).
- Extracción asistida por microondas: se fundamenta en el uso de ondas de microondas, las cuales pueden penetrar con facilidad los poros de la muestra a extraer, haciendo que el solvente pueda quedar atrapado dentro de éstos, y posteriormente ser calentados por dichas ondas. Esta técnica es considerablemente más rápida y se usan menores cantidades de solventes en comparación a técnicas como la extracción Soxhlet o por ultrasonido (Martínez, 2020).

1.5. Ratón (*Mus musculus*)

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

1.5.1. Clasificación taxonómica

Tabla N°7: Taxonomía del ratón.

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Familia	Muridae
Género	<i>Mus</i>
Especie	<i>Mus musculus</i>

1.5.2. Descripción zoológica

Se trata de un pequeño roedor, perteneciente a la familia *Muridae*. En los ejemplares adultos, su largo ronda desde los 6,5 a 9,5 centímetros, y sus colas pueden llegar a medir hasta 10,5 centímetros y llegan a pesar desde 12 a 30 gramos. Su pelaje es variado en color, yendo desde el marrón claro, hasta el negro, presentando una coloración más clara, o incluso blanca en su vientre. Sus largas colas carecen o tienen muy poco pelaje, y tienen filas circulares de anulaciones (células de piel con forma de escama) (Ballenger, 1999).

Esta especie se caracteriza por su gran potencial reproductivo, la cual se da durante todo el año, aunque en los ratones silvestres, se pueden presentar épocas reproductivas que van desde abril hasta septiembre. Su ciclo estral dura de 4 a 6 días, y el estro (momento en el que la hembra acepta aparearse) dura menos de un día (Ballenger, 1999).

Las hembras suelen tener entre 5 a 10 camadas por año, siempre y cuando las condiciones ambientales y alimenticias sean propicias. La gestación se da por aproximadamente 21 días y las camadas se pueden componer de 3-12 crías, las cuales nacen sin pelo y ciegas. Estas están totalmente cubiertas de pelo a los 10 días, abren los ojos a los 14 días, se destetan a las 3 semanas y alcanzan su madurez sexual a las 5-6 semanas. Su promedio de vida es de 2 años en cautiverio, pero se tienen registros de algunos individuos que han llegado a vivir hasta 6 años. En contraste, los ejemplares silvestres no suelen vivir más de 18 meses, ya que suelen ser presas de otros animales (Ballenger, 1999).



Figura 12. *Mus musculus*. (https://www.naturalista.mx/taxa/44705-Mus-musculus/browse_photos).

1.5.3. Hábitat

Se cree que la especie *Mus musculus* es nativa de Asia Central o Mediterránea, lugar donde empezó a propagarse durante miles de años, primero con el desarrollo de la agricultura, y posteriormente, por las rutas comerciales (tanto terrestres como marítimas). En la actualidad, el ratón suele vivir en una estrecha relación con el ser humano, es decir, es considerado como una especie comensal, viviendo en casas, edificios, plantaciones y zonas boscosas cerca de los asentamientos humanos. Gracias a esta asociación con el hombre, los ratones han podido abarcar prácticamente todos los rincones del mundo, a excepción de las regiones árticas, las cuales tampoco son habitadas por el ser humano (Lund, 2015).

1.5.4. Ratón de laboratorio

El ratón más frecuentemente usado en experimentos pertenece a la especie *Mus musculus* y se emplea comúnmente en la investigación científica. Estos ratones se crían, específicamente para su uso en bioterios de laboratorios, y en muchos casos, se modifican genéticamente para comprender de mejor manera la biología y patologías presentes en el ser humano y otros animales (Albus, 2012).

Los ratones, representan el modelo ideal para la investigación biomédica y de medicina comparativa, ya que presentan muchas similitudes con el ser humano a nivel de anatomía y fisiología. Además, el hombre y los ratones presentan aproximadamente 30.000 genes, de los cuales, el 95% ejercen funciones similares (Bryda, 2013).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Por otro lado, el uso de ratones como biomodelo presenta otras grandes ventajas ligadas a su pequeño tamaño, como lo son sus pocas exigencias de espacio y alimentación, tiempos de gestación cortos, número relativamente grande de descendientes y un tiempo de vida corto. Lo que representa un costo de mantenimiento mucho más económico en comparación a otras especies animales (Bryda, 2013).

Además, los ratones de laboratorio presentan innumerables virtudes, hablando desde el punto de vista genético, ya que en la actualidad se posee una gran cantidad de información en cuanto a su genoma se refiere. Todo esto, gracias a su secuenciación en el año 2002, luego de la del ser humano en el año 2001. Dicha base de información, permite realizar comparaciones de todo el genoma entre ambas especies, permitiendo así la identificación de los genes y su caracterización (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001; Waterston *et al.*, 2002).

1.5.5. Líneas genéticas de ratón (*Mus musculus*) empleadas en la investigación Científica

Unos de los factores más importantes a la hora de planificar una investigación que requiera el uso de animales de laboratorio, es la calidad genética de los individuos a emplear; ya que, de manera análoga a los perros y gatos, en los ratones de laboratorio existen razas, o mejor dicho, líneas, las cuales han sido producto de cruces planificados durante décadas, de manera tal, que estos nuevos individuos presenten una o varias características que suelen ser de interés para una determinada investigación (Benavides & Guénet, 2003).

Es así, como desde el punto de vista genético, los ratones pueden clasificarse en dos grandes líneas:

- **Líneas consanguíneas:** una población es consanguínea cuando sus progenitores comparten uno o varios antecesores comunes, es decir, existe un acoplamiento entre individuos emparentados (Benavides & Guénet, 2003).

En los roedores, la consanguineidad es muy frecuente en estado salvaje, debido a que viven en territorios relativamente pequeños y las migraciones no son comunes. Por su parte, las poblaciones que se crían en laboratorios son relativamente consanguíneas por su tamaño limitado y el apareamiento entre animales emparentados son frecuentes (Benavides & Guénet, 2003).

Para que una línea de ratones sea considerada consanguínea, esta debe provenir de una única pareja reproductora, en donde sus descendientes se han apareado entre hermanos y hermanas, durante un mínimo de 20 generaciones (Benavides & Guénet, 2003).

Gracias a esto, los individuos pertenecientes a estas líneas presentan una genética casi idéntica, presentando entre si una gran uniformidad en sus rasgos físicos y de comportamiento, haciéndolos un modelo idóneo para estudios genéticos o en aquellos donde se quiera mitigar el efecto de la variabilidad genética (Chebib *et al.*, 2021).

Entre las líneas consanguíneas más empleadas se tienen:

- ✓ C57BL/6: es un ratón de pelaje marrón oscuro, casi negro; son muy sensibles a los ruidos y olores. Es empleado en estudios de alcoholismo, cardiovasculares, diabetes, obesidad, alopecia, entre otros (Simon *et al.*, 2013).



Figura 13. Ratón de la línea consanguínea C57BL/6.

- ✓ BALB/c: son una cepa albina (pelaje blanco y ojo rojos), del cual derivan muchas otras sub-cepas. Se caracterizan por ser muy dóciles ante la manipulación humana, además de presentar una alta tasa de cáncer (pulmonar y renal) al llegar a la edad adulta. Esta cepa es empleada en estudios cardiovasculares, inmunología, cáncer, entre otros (Nagy *et al.*, 2023).



Figura 14. Ratón de la línea consanguínea BALB/c.

- ✓ Nude: es una cepa que se caracteriza por la ausencia de pelo en todo su cuerpo, de allí viene su apodo de *nude* (desnudo en inglés). Esta línea es de vital importancia en el área de los xenotransplantes (trasplante entre

especies), ya que a estos se les puede trasplantar tumores humanos con poca probabilidad de rechazo (Fogh & Giovanella, 1978).



Figura 15. Ratón de la línea consanguínea Nude.

- **Líneas no consanguíneas:** este término hace referencia a aquellos animales cuya descendencia no se encuentra emparentada. Son los ratones más empleados en la investigación científica, especialmente por su bajo costo, alta tasa de reproducción y docilidad. Éstos, al no ser genéticamente definidos, son ideales para algunos tipos de investigación, pero inútiles para otras donde se requiera de una genética establecida (Benavides & Guénet, 2003).

Este grupo de roedores es el que mejor representa la variabilidad genética en una población humana; por esta razón, los ratones no consanguíneos son ampliamente utilizados en estudios de toxicología y farmacología (Benavides & Guénet, 2003).

Entre los ratones no consanguíneos más populares son los Swiss-Webster, CD-I, ICR y CF-I (Benavides & Guénet, 2003).

1.5.6. Estudios de promoción capilar en ratones C57BL/6

Los ratones de la línea C57BL/6 son comúnmente empleados en estudios de tratamiento de la alopecia porque son más propensos a la pérdida de cabello o alopecia, y los mecanismos involucrados en esta patología son similares a los que se presentan en los seres humanos (alta sensibilidad a la testosterona), por consiguiente, son el modelo más útil para probar la eficacia de diversas sustancias con potencial antiandrogénico. Además, los ratones C57BL/6 tienen un tiempo de generación corto y son relativamente económicos de criar y mantener (Oh *et al.*, 2014).

En una investigación realizada en la Universidad de Keimyung, Corea del Sur, se realizó un estudio sobre el efecto del aceite de menta en el crecimiento capilar en ratones C57BL/6. Se emplearon 20 animales, los cuales fueron repartidos aleatoriamente en 4 grupos en función a la solución tópica que se les aplicaba: solución salina (SA), aceite de jojoba (JO), minoxidil al 3% (MXD) y aceite de menta (*Mentha piperita*) al 3% (PEO). El efecto de las aplicaciones tópicas fue

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

evaluado durante 4 semanas, tomando como referencia una escala cualitativa, análisis histológico, actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la expresión de un factor de crecimiento (IGF-1). De los 4 grupos experimentales, el grupo PEO presentó un crecimiento capilar más acelerado y un mayor engrosamiento de la epidermis y folículos pilosos, en comparación a los demás grupos (Oh *et al.*, 2014).

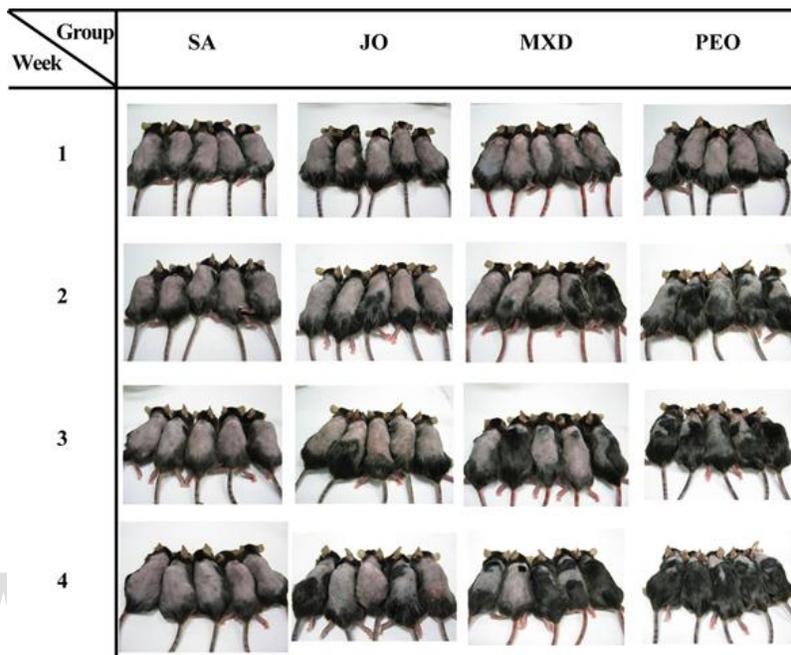


Figura 16. Observación macroscópica del pelaje en ratones C57BL/6. Se afeitó el lomo de los ratones y se aplicaron tópicamente los compuestos de ensayo durante 4 semanas. SA; solución salina, JO; aceite de jojoba, MXD; minoxidil al 3 %, PEO; aceite de menta al 3% (Oh *et al.*, 2014).

Una investigación realizada en la Universidad Normal de Anhui, China, demostró el prometedor potencial del extracto de la fruta de la *Gardenia florida* (GFFE). En el estudio se examinó el efecto del GFFE a diferentes concentraciones (0,5%, 1% y 2%), agua purificada (CK) y minoxidil al 2% (MXD) administrados por vía tópica en 5 grupos de ratones de la línea C57BL/6, a los cuales se les había afeitado la región dorsal de su cuerpo. La evaluación del crecimiento capilar se realizó mediante la medición de cabellos arrancados, análisis histológico, y exámenes bioquímicos. Se concluyó que el tratamiento con GFFE, causa un aumento significativo en el número, tamaño y profundidad de los folículos pilosos, traducándose esto en una promoción del crecimiento capilar local (Liu *et al.*, 2022).

En el año 2013, se realizó un estudio en la Universidad de Kinki (Japón), en donde se analizó el efecto de la aplicación tópica de extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*),

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

en una dosis de 20 mg/día/ratón, sobre ratones de la línea C57BL/6, que presentaban una interrupción del crecimiento capilar inducida por un tratamiento con testosterona. La evaluación del crecimiento capilar se realizó mediante una escala cualitativa y la inhibición de la enzima 5aR. Al finalizar el estudio se demostró una inhibición de dicha enzima de entre el 82,4% y el 94,6% con un crecimiento del cabello del área afeitada (Murata *et al.*, 2013).

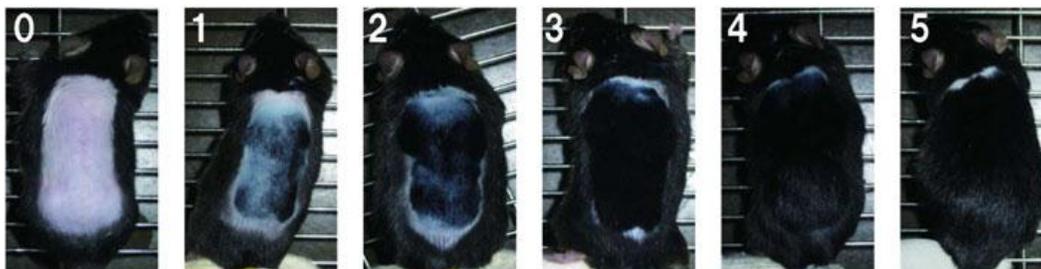


Figura 17. Puntuaciones para la evaluación del crecimiento capilar: 0= sin crecimiento; 1= menos del 20% de crecimiento, 2= 20% al 40% de crecimiento, 3= 40% al 60% de crecimiento, 4= 60% al 80% de crecimiento, 5= 80% al 100% de crecimiento (Murata *et al.*, 2013).

1.6. Pruebas estadísticas

1.6.1. Prueba de Shapiro-Wilk

Es una prueba que se emplea para determinar si un conjunto de datos presenta una distribución normal, es decir una distribución gaussiana; la cual es un concepto estadístico que describe como se distribuyen los datos alrededor de un valor promedio (Figura 18). Cabe destacar que, la distribución normal es uno de los parámetros más importantes en el mundo de la estadística, ya que muchas pruebas requieren de una normalidad en los datos para poder obtener análisis y conclusiones válidas (Tapia *et al.*, 2021).

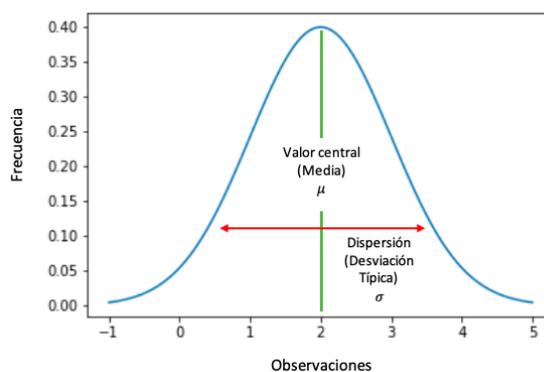


Figura 18. Ejemplo gráfico de un conjunto de datos que presentan una distribución normal. Nótese que la gráfica presenta una forma de campana, la cual se le conoce como campana de Gauss.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Inicialmente, en esta prueba se deben ordenar los datos de mayor a menor, obteniéndose así un vector muestral, para luego calcular la media y varianza muestral. Posteriormente, se genera un estadístico W (que en la mayoría de los programas estadísticos se representa como p-valor), el cual es comparado con un valor crítico (α) que en la mayoría de los casos es 0,05 (Ecuación. 1) (Tapia *et al.*, 2021).

$$W = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i Y_i^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \quad \text{Ec (1)}$$

Donde Y_i son los datos ordenados de la muestra (de menor a mayor), y $\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$ la varianza (Tapia *et al.*, 2021).

El estadístico W es invariable en escala y origen, adquiriendo un valor máximo de 1 y mínimo de $n-1$. De manera tal, que este realmente actúa como un coeficiente de correlación al cuadrado (R^2), y en este sentido, los valores más cercanos a 1 indican una mayor correspondencia a la normal (Tapia *et al.*, 2021).

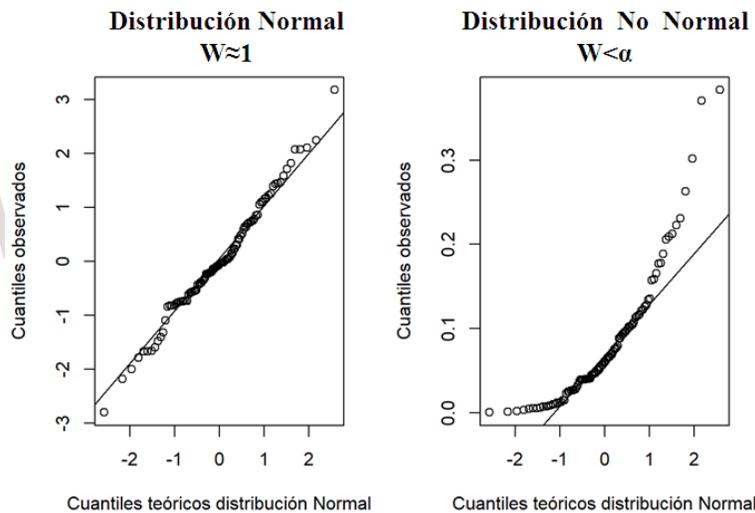


Figura 19. Gráficos de distribución. A la izquierda, gráfico con distribución normal ($W \approx 1$). A la derecha, gráfico con distribución no normal ($W < \alpha$). Nótese que entre más cercano es W a 1, el conjunto de datos se correlaciona más a la normal (línea recta).

Sí el p-valor (o W) de un conjunto de datos es mayor que 0,05 ($p\text{-valor} > 0,05$) se aprueba la hipótesis nula (H_0), es decir, se considera que dicho conjunto de datos presenta una distribución normal. Por el contrario, si dicho p-valor es menor que 0,05 ($p\text{-valor} < 0,05$) se aprueba la hipótesis alternativa (H_1), es decir, los datos no presentan una distribución normal (Tapia *et al.*, 2021).

1.6.2. Prueba de ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA, ANalysis Of VAriance, según la terminología en inglés) es un conjunto de técnicas estadísticas de gran utilidad a la hora de comparar dos o más grupos, cuando se realizan mediciones repetidas. Por lo cual, la prueba de ANOVA se emplea en 4 posibles situaciones (Dagnino; 2014):

- Cuando hay más de dos grupos que necesitan ser comparados. El ANOVA también puede ser empleado para comparar solamente dos grupos, de hecho, el test t de Student es un caso especial de ANOVA (Dagnino; 2014).
- Cuando hay mediciones repetidas en más de dos ocasiones o cuando hay dos o más grupos en quienes se hacen mediciones repetidas en más de dos ocasiones (Dagnino; 2014).
- Cuando los sujetos pueden variar en más de una característica que afecta el resultado y se necesita juzgar su efecto (Dagnino; 2014).
- Cuando se desea analizar, simultáneamente, el efecto de dos o más tratamientos diferentes (Dagnino; 2014).

En ANOVA, los términos de “una vía, un factor o un sentido” se refieren a la variable que determina los grupos de estudio, es decir, la variable independiente. Un claro ejemplo de este tipo de ANOVA, sería la asociación entre varios fármacos (variable independiente) y la producción de un metabolito luego de su aplicación (variable dependiente) (Dagnino; 2014).

En la prueba de ANOVA se genera un estadístico F (en honor a Fisher), en donde se requiere calcular la varianza de las medias de los grupos (S_{entre}) y la varianza dentro de cada grupo (S_{dentro}) (Dagnino; 2014).

$$F = \frac{S_{entre}}{S_{dentro}} \quad Ec (2)$$

Suponiendo un que todos los grupos provengan de una misma población, las varianzas calculadas deberían ser iguales o muy parecidas entre sí, lo que se traduce en un valor de F próximo a 1, siendo así el valor de p mayor. Por el contrario, si la media de uno o más grupos es distinta, la varianza entre grupos será desproporcionalmente mayor, donde el valor de F se ira apartando progresivamente de 1, siendo el valor de p menor (Dagnino; 2014).

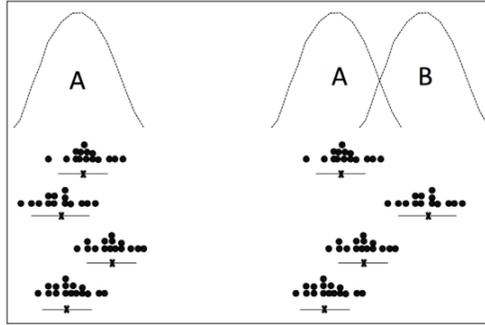


Figura 20. Explicación gráfica de la prueba de ANOVA y el cálculo de F. A la izquierda se muestran 4 muestras que provienen de una misma población (A), y por lo tanto el valor de F es cercano a 1 y p es grande. A la derecha, se muestran 4 muestras, en donde la media de una de estas es distinta a las demás, donde F se aleja de 1 y el valor de p es pequeño.

Si el estadístico p es menor que el valor crítico ($p < 0,05$), se aprueba la hipótesis alterna (H_1), es decir, existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos. Por el contrario, si el estadístico p es mayor que el valor crítico ($p > 0,05$), se aprueba la hipótesis nula (H_0), es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos (Kim, .2017).

Si bien es cierto, que la prueba ANOVA permite determinar si existen diferencias significativas entre las medias de un conjunto de grupos. Esta no es capaz de discernir, por sí solo, entre que grupos se encuentra tal diferencia. Por esta razón, en algunos casos es necesario realizar un análisis de los datos *a posteriori* (post-hoc) (Nuñez, 2018).

1.6.3. Método de Tukey

Los análisis de varianza confirman la existencia de diferencias significativas entre varios grupos, hecho esto, es deseable investigar que medias son distintas entre sí. Para esto se emplean diversos métodos cuyo objetivo es la identificación de las medias estadísticamente diferentes, las cuales reciben la denominación “contrastes para comparaciones múltiples” (Nuñez, 2018).

Una de estas técnicas es la prueba Tukey, permite la comparación de cada una las medias de diferentes grupos con una media, a la que se considera como un “valor normal”, y a esta última se le denomina “diferencia honestamente significativa” (HDS). De manera similar a una prueba t-Student, en esta prueba, se genera un estadístico p, el cual es comparado con un valor crítico (usualmente 0,05). Cuando este estadístico p es mayor que el valor crítico ($p > 0,05$), se aprueba la hipótesis nula (H_0) y se establece que no existen diferencias significativas entre las medias de los grupos. Caso contrario, si p es menor que el valor crítico ($p < 0,005$), se aprueba la H_1 y se establece que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias (Nuñez, 2018).

Justificación

En la actualidad, el cabello juega un papel importante en la calidad de vida de las personas ya que, si bien es cierto que su pérdida no trae consigo una consecuencia en la fisiología normal del individuo, sí ejerce un impacto negativo a nivel social, cultural y psicológico de aquellos pacientes que padecen de alopecia, en sus diferentes grados de evolución. Aunque hoy en día se han desarrollado diversos fármacos que tienen como objeto el tratamiento de esta patología, la gran mayoría de éstos son costosos, de difícil acceso y aplicación, y peor aún, múltiples efectos secundarios; los cuales pueden entorpecer en gran medida el efecto y adherencia del tratamiento por parte del paciente.

Es así como, se ha experimentado un interés creciente en soluciones provenientes de la naturaleza, especialmente en plantas que son reconocidas por sus innumerables cualidades medicinales, las cuales, con el tratamiento adecuado, pueden convertirse en soluciones más eficaces y con efectos secundarios mínimos, o inclusive, inexistentes. De esta forma, se justifica el estudio de la capacidad promotora del crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU, como una posible alternativa eficaz, natural y sin efectos adversos, para el tratamiento de la alopecia.

www.bdigital.ula.ve

Hipótesis

En vista de que los extractos derivados del *Rosmarinus officinalis* (aceite esencial, extracto alcohólico e hidrolato); contienen compuestos con el potencial de estimular el crecimiento capilar mediante diversos mecanismos, es de esperar que los preparados elaborados con éstos también presenten dichas propiedades, demostrando así tener un efecto estimulante en el crecimiento capilar en ratones (*Mus musculus*) de la línea C57BL/6, al ser aplicados por vía tópica.

En concordancia con la hipótesis formulada, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener el extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) a partir de las hojas de la planta, mediante extracción en Soxhlet con etanol al 70%.
- Formular y elaborar un champú y tónico capilar, que contengan aceite esencial, extracto e hidrolato de romero (*Rosmarinus officinalis*).
- Evaluar la capacidad de crecimiento capilar de manera individual (aceite esencial, extracto e hidrolato) y conjunto (en forma de tónico capilar y champú), en ratones (*Mus musculus*) de la línea C57BL6//BIOU.

Procedimiento experimental

Esta investigación se desarrolló en tres etapas. La primera, consistió en la elaboración del extracto alcohólico de romero (*Rosmarinus officinalis*), dicho procedimiento se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Los Andes (ULA). La segunda etapa, implicó la formulación y elaboración del champú y tónico capilar con los extractos de romero (aceite esencial, hidrolato y extracto), la cual se fabricó dentro de la empresa NISOQUIM.C.A, laboratorio ubicado en la ciudad de Ejido, en el estado Mérida. Finalmente, la tercera etapa, consistió en la realización de un ensayo preclínico en ratones, de la línea C57BL6//BIOU, de los productos elaborados en la etapa anterior, dicho ensayo se llevó a cabo dentro de las instalaciones del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA).

5.1. Elaboración del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*)

5.1.1. Materiales y equipos empleados

- Balón fondo redondo de 3.000 mL.
- Condensador.
- Manta calefactora.
- Reóstato.
- Mangueras de goma.
- Soporte universal.
- Cilindro graduado de 1.600 mL.
- Frascos de color ámbar de 4 L.
- Embudo sin tallo.
- Papel filtro (Marca TOYO).
- Estufa.
- Bandejas metálicas.
- Vasos de precipitado de 500 mL.
- Soxhlet.
- Rotavapor (Marca BUCHI R-200).
- Papel de pH (Marca NEWSTAR).

5.1.2. Reactivos Empleados:

Tabla N°8: Reactivos empleados en la elaboración del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*).

Reactivo
Etanol
Agua destilada

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

5.1.3. Recolección, secado y preparación del material vegetal

Se recolectaron 10 kg de material vegetal perteneciente a la especie *Rosmarinus officinalis* en la localidad de Mucuchíes, municipio Rangel, del estado Mérida-Venezuela. Todo el material fue lavado con abundante agua para retirar la suciedad presente.

Luego, se procedió a separar las hojas del resto de la planta (tallos, flores y semillas). Las hojas fueron secadas en una estufa a una temperatura de 40°C, durante un período de 24 horas, obteniéndose 2,330 Kg de hojas secas.



Figura 21. Separación de las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) del resto de la planta.

5.1.4. Obtención del extracto etanólico de romero (*Rosmarinus officinalis*)

Las hojas secas fueron sometidas a una extracción continua en Soxhlet, en una proporción de 250 g de material vegetal con 600 mL de etanol al 70%, a una temperatura de 70°C durante 4 horas continuas. Se realizaron 15 extracciones en total, con un gasto de 10,36 L de etanol al 70%.

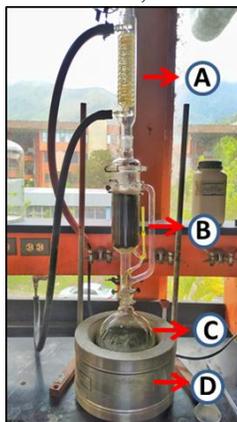


Figura 22. Montaje del equipo empleado en la extracción. A) Condensador. B) Soxhlet. C) Balón fondo redondo de 3 L. D) Manta calefactora.

El extracto obtenido fue concentrado hasta una tercera parte de su volumen inicial (3,2 L), en un rotavapor a una temperatura de 70°C por 2 horas. Se obtuvo un líquido ligeramente espeso, de coloración verde-marrón, olor agradable y de pH=5; el cual fue resguardado en un envase de vidrio color ámbar hasta su posterior uso.

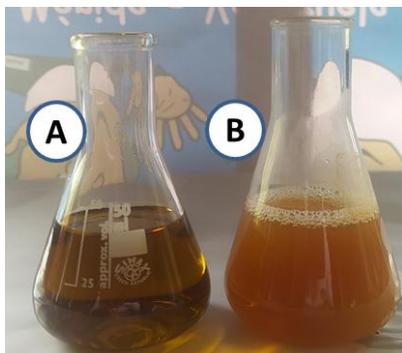


Figura 23. A) Extracto sin concentrar. B) Extracto concentrado.

Para determinar el rendimiento del extracto obtenido, se procedió a pesar 6 matraces, luego se añadió a cada uno 10 mL del extracto (medidos con una pipeta volumétrica) y se pesaron nuevamente. Posteriormente, se secó el extracto dentro de la estufa a una temperatura de 40°C por 48 horas y se pesaron los matraces de nuevo.



Figura 24. Extracto seco de romero.

El cálculo de gramos de extracto seco por mL de extracto se realizó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de extracto seco} = \frac{(g_{\text{matraz+extracto seco}} - g_{\text{matraz}})}{10 \text{ mL}} \times 100 \quad \text{Ec (3)}$$

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

En la **Tabla N°9** se muestran los datos correspondientes al cálculo del % de pureza del extracto de romero.

Tabla N°9: Datos empleados para la determinación de la pureza del extracto de romero obtenido.

Matraz	<i>G</i> _{matraz}	<i>G</i> _{matraz+extracto}	<i>G</i> _{matraz+extracto seco}	% de pureza	Promedio
1	41,168	50,340	41,458	2,9 %	2,7%
2	40,584	49,724	40,862	2,8 %	
3	25,533	34,451	25,778	2,5 %	
4	36,360	45,551	36,620	2,6 %	
5	39,836	49,002	40,109	2,7 %	

Obteniéndose así, un porcentaje de pureza promedio de 2,7 % m/v, lo que equivale a 86,4 g de extracto seco en 3,2 L de extracto.

Ahora bien, el rendimiento de la extracción se calculó con la siguiente formula, tomando en consideración que se obtuvieron 86.4 g de extracto seco y 2.330 g de hojas secas:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{g \text{ de extracto seco}}{2.330 \text{ g}} \times 100 \quad \text{Ec(4)}$$

Finalmente, se determinó que el rendimiento de la extracción fue del 3,7%.

5.2. Elaboración del champú y tónico capilar

5.2.1. Materiales y equipos empleados

- Varilla de vidrio.
- Cilindro graduado de 100 mL.
- Vasos de precipitado de 50 mL.
- Envases plásticos.
- Embudos de tallo largo.
- Vidrios de reloj.
- pHmetro (Marca CORNIN Model 12).
- Frascos color ámbar.
- Espátulas de metal.
- Balanza digital.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas volumétricas
- Soporte universal.
- Fiolas.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

5.2.1. Formulación del champú y tónico capilar

A continuación, en las **tablas N°10 y N°11**, se muestran los datos correspondientes a la formulación del champú y tónico capilar; las formulaciones se realizaron modificando las proporciones descritas por Samaniego y Fuertes (2017); y Maurtua y Zuguiña (2018).

Tabla N°10: Formulación del champú.

Componente	% m/m	Marca y pureza
Disolvente	40%	N/A
Tensoactivos	11,6%	N/A
Controlador de dureza del agua	0,08%	N/A
Hidratante	3%	N/A
Regulador de acidez	0,08%	N/A
Conservantes	0,2%	N/A
Espesante	1,9%	N/A
Hidrolato de romero	40%	Laboratorio Industrial de Productos Químicos Mérida C.A, No específica.
Extracto de romero	3,1%	Fabricación propia, 2,7%.
Aceite esencial de romero	0,04%	QuimicHouse, 98% v/v.

N/A: no aplica.

Tabla N°11: Formulación del tónico capilar.

Componente	% m/m	Marca y pureza
Disolvente	27%	N/A
Vehículo	30%	N/A
Humectantes	6%	N/A
Hidrolato de romero	27%	Laboratorio Industrial de Productos Químicos Mérida C.A, No específica.
Extracto de romero	5%	Fabricación propia, 2,7% m/v.
Aceite esencial de romero	5%	QuimicHouse, 98% v/v

N/A: no aplica.

5.2.2. Elaboración del champú

Inicialmente, se midieron los volúmenes adecuados de disolvente e hidrolato de romero, a estos se les adicionaron las cantidades necesarias de los tensoactivos; y se agitó hasta su total dilución.

Se procedió a pesar las cantidades necesarias de hidratante, regulador de acidez y conservantes. Posteriormente, se incorporaron estos componentes a la mezcla líquida y, seguidamente, se mezclaron hasta lograr su total integración.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

La mezcla se dejó reposar hasta la desaparición de la espuma, y se procedió a medir el pH de la mezcla. La acidez del champú se corrigió agregando pequeñas cantidades del regulador de acidez hasta obtener un pH deseado de 6,10.

Luego, se agregó pequeños volúmenes de del espesante hasta obtener la densidad deseada en la mezcla.

Finalmente, se añadió la cantidad adecuada de extracto y aceite esencial de romero. El preparado formulado fue resguardado en botellas de vidrio color ámbar debidamente rotuladas.

5.2.3. Elaboración del tónico capilar

Se midieron y mezclaron las cantidades necesarias de disolvente, extracto e hidrolato de romero y humectantes, hasta lograr su completa integración. En un recipiente aparte, se mezclaron el vehículo con la cantidad establecida de aceite esencial de romero y se agitó hasta homogenizar la solución.

Finalmente, ambas soluciones se mezclaron vigorosamente hasta su total integración. El preparado elaborado fue resguardado en una botella de vidrio color ámbar debidamente rotulada.

5.3. Preparación del aceite esencial de romero al 0,135%

Se mezclaron 6 ml de aceite esencial de romero (al 98% v/v) con 114 mL de aceite mineral. El preparado fue guardado en un recipiente de vidrio color ámbar debidamente rotulado.

5.4. Preparación del extracto de romero al 5%

Se mezclaron 6 ml de aceite extracto de romero (al 2,7% m/v) con 114 mL de agua destilada. El preparado fue guardado en un recipiente de vidrio color ámbar debidamente rotulado.

5.5. Ensayo en ratones C57BL6//BIOU

5.5.1. Aval del Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA)

El ensayo en ratones realizado en esta investigación, fue previamente aprobado por la Comisión de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (CEBIOULA), mediante el aval de aprobación (**Anexo 1**) y el formulario de solicitud, en este último documento se detallan los aspectos de importancia sobre el uso de los animales de experimentación que incluyen: resumen de la investigación, objetivos, metodología a emplear, especie, línea o cepa, sexo, cantidad de animales, aplicación de fármacos, anestesia o analgesia, condiciones ambientales y eutanasia. Todo esto con el fin de garantizar el bienestar de los animales durante todas las etapas de la investigación.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

5.5.2. Elección de la línea

Los ratones de la línea C57BL/6 son comúnmente empleados en estudios de tratamiento de la alopecia porque son más propensos a la pérdida de cabello o alopecia, y los mecanismos involucrados en esta patología son similares a los que se presentan en los seres humanos (alta sensibilidad a la testosterona), por consiguiente, son el modelo más útil para probar la eficacia de diversas sustancias con potencial de estimular el crecimiento capilar. Además, los ratones C57BL/6 tienen un tiempo de generación corto y son relativamente económicos de criar y mantener (Porter, 2003).

5.5.3. Elección del sexo

Los modelos animales desempeñan un papel fundamental en la investigación biomédica. En el caso de los estudios de alopecia, se emplean exclusivamente ratones (*Mus musculus*) de la línea C57BL/6. Esta elección, se ve guiada principalmente por razones que están relacionadas con la biología y fisiología del animal, y también, por cuestiones prácticas al momento de realizar el experimento, entre las cuales resaltan (Porter, 2003):

- Diferencias hormonales: los ratones machos y hembras difieren considerablemente en cuanto a su perfil hormonal se refiere, especialmente en su nivel de andrógenos (hormonas sexuales). La testosterona, está estrechamente ligada al desarrollo y progresión de la alopecia. Al emplearse ratones machos, se puede replicar con mayor precisión el entrono hormonal ligado a la alopecia androgénica (Porter, 2003).
- Aumento del tamaño de la muestra: el uso de ratones hembras, trae consigo la introducción de una variable adicional dentro del sistema de estudio, haciendo que un grupo que por sí solo ya es heterogéneo (en cuanto a genética se refiere), sea doblemente heterogéneo debido a la inclusión de la variable del sexo de los animales. Esto se puede traducir, en la duplicación del número de individuos en el estudio, con su consecuente aumento en costos: jaulas, alimentación, entre otros (Porter, 2003).
- Razones prácticas: los ratones machos suelen ser de mayor tamaño en comparación a las hembras, lo cual los hace más fáciles de manipular y manejar durante la realización de los experimentos. Por otro lado, las hembras pasan por periodos reproductivos (ciclo estral), lo cual puede inducir una variabilidad indeseada en el estudio (Porter, 2003).

5.5.4. Tamaño de la muestra

La determinación del tamaño de la muestra es un aspecto fundamental de cualquier diseño experimental, el cual depende del poder del estudio previsto, el tamaño del efecto y los niveles aceptables de error (Zhang y Hartmann, 2023). Un tamaño de muestra pequeño puede dar lugar a un poder estadístico insuficiente, reduciendo así la capacidad de detectar un efecto real. Por el

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

contrario, un tamaño de muestra grande, mejora la representación de la población, y por consiguiente, la precisión de los resultados. Sin embargo, el tamaño de la muestra ideal es el que emplee el número de individuos mínimo que permita observar al fenómeno de estudio, teniendo en cuenta razones prácticas y económicas.

En estudios de crecimiento capilar en ratones, se han empleado diferentes tamaños de muestra para evaluar la eficacia de diversos tratamientos. Por ejemplo, en el año 2020, se realizó un estudio en ratones C57BL/6, en donde se los dividió en 4 grupos de 5 ratones (n=5) cada uno (figura 24), con la finalidad de evaluar el efecto del minoxidil y la timosaponina BII (Xiao *et al.*, 2020).

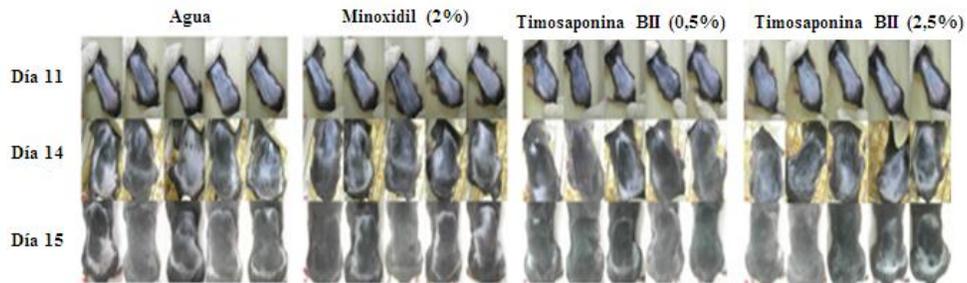


Figura 25. Efectos promotores en el crecimiento capilar de la timosaponina BII (Xiao *et al.*, 2020).

Otro estudio realizado en China, consistió en estudiar el efecto en la promoción de crecimiento capilar del resveratrol en ratones C57BL/6, empleando 2 grupos de 3 ratones (n=3) cada uno (Figura 25), evaluando así varios parámetros de crecimiento: porcentaje de recuperación, largo del pelo, diámetro de pelo, etc. (Zhang *et al.*, 2021). Estos estudios proporcionan un útil precedente para el uso de grupos pequeños en investigaciones de crecimiento capilar en ratones C57BL/6.

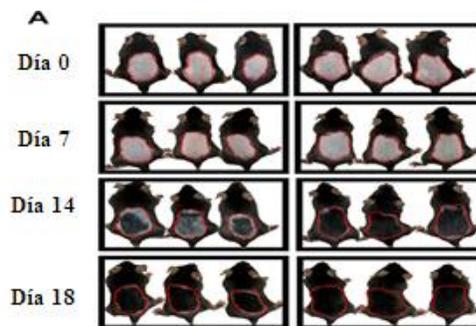


Figura 26. Observaciones macroscópicas del crecimiento del pelo y ciclo del cabello ‘*in vivo*’ (Zhang *et al.*, 2021).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Dadas las consideraciones anteriores, en esta investigación se planteó un tamaño de muestra de 4 ratones (n=4) por grupo, el cual se justifica de la siguiente manera:

- **Idoneidad del modelo animal empleando:** el ratón C57BL/6 es el modelo de preferencia en los estudios de crecimiento capilar y alopecia, esto debido a su poca variabilidad genética, fácil adquisición y ciclo de crecimiento capilar ampliamente estudiado (Orăsan & Coneac, 2018).
- **Consideraciones prácticas y éticas:** el uso de una menor cantidad de animales está en línea con los principios de las “3Rs” (reemplazo, reducción y refinamiento), para minimizar el número de animales empleados (Palacio *et al.*, 2021).
- **Precedentes en la literatura:** estudios anteriores han utilizado con éxito un tamaño de muestra similar, o incluso, menor para demostrar la eficacia de los tratamientos para estimular el crecimiento capilar. Esto sugiere que, un tamaño de muestra de 4 ratones (n=4) por grupo es adecuado para estudiar el efecto de los tratamientos estudiados (Xiao *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).
- **Optimización de recursos:** un tamaño de muestra pequeña permite un uso más eficiente de los recursos (comida, agua, estudios especializados, alojamiento, entre otros).

5.5.5. Condiciones ambientales y de alojamiento

Durante el transcurso del ensayo en ratones, se proporcionaron las siguientes condiciones ambientales y de alojamiento:

- **Tipo de Jaula:** T1.
- **Individuos por Jaula:** 4.
- **Temperatura Ambiental:** (22±1) °C.
- **Periodo de Adaptación:** 1 semana.
- **Alimento y Agua:** *at libitum* (a demanda).
- **Ciclo de Luz/Oscuridad:** 12 horas.

5.5.6. Procedimiento experimental

Se emplearon 30 ratones machos de la línea C57BL6//BIOU, de aproximadamente 8 semanas de vida, con un peso promedio de 25,7 g; a los cuales se les proporcionó un periodo de adaptación de 1 semana con comida y agua *at libitum* (a demanda).

Terminado el periodo de adaptación, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina, con una dosis de 90 mg/Kg de ketamina y 10 mg/Kg de xilacina, por vía

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

intraperitoneal, obteniéndose un tiempo de anestesia promedio de 7-10 minutos, luego se procedió a afeitar un área de 4 cm² (2 x 2 cm) de la región dorsal de su cuerpo (Figura 28), y cada animal fue identificado mediante pequeños cortes en sus orejas (Figura 27).

Tabla N°12: Marcas de identificación de los ratones.

Ratón:	Marca:
1	Sin marca (SM).
2	Oreja izquierda cortada (OIC).
3	Oreja derecha cortada (ODC).
4	Ambas orejas cortadas (AOC).

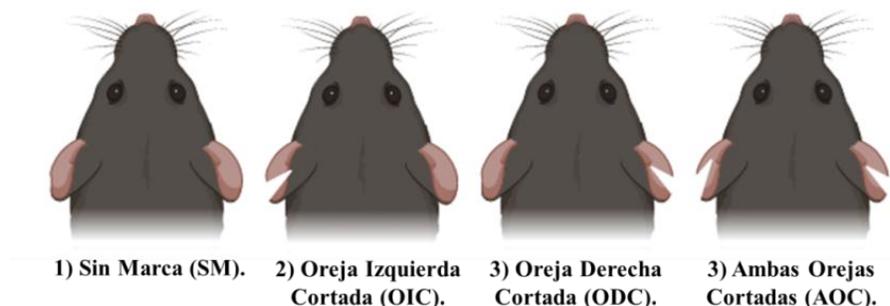


Figura 27. Representación del marcado de los ratones: 1) Sin Marca (SM). 2) Oreja Izquierda Cortada (OIC). 3) Oreja Derecha Cortada (ODC). 4) Ambas Orejas Cortadas (AOC).

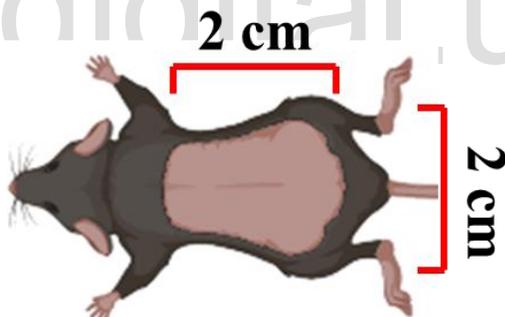


Figura 28. Representación del área afeitada en la región dorsal de los ratones.

Pasado el tiempo de anestesia, los ratones fueron distribuidos, de manera aleatoria, en 7 grupos distintos, conformados por 4 individuos cada uno, en función de la aplicación tópica que se les proporcionó: agua destilada (AD), aceite esencial de romero al 4,9% (AR), extracto de romero al 0,135% (ER), hidrolato de romero (HR), tónico capilar (TC), champú (CH) y minoxidil al 5% (MDX).

Adicionalmente, se añadió un octavo grupo, llamado grupo control-control (CC), el cual estaba constituido por 2 ratones. A dicho grupo no se le sometió a ninguno de los procedimientos

mencionados (anestesia, rapado, evaluación capilar y aplicación de sustancias). Este tiene la finalidad de servir como una referencia de un crecimiento capilar normal.

Las dosis de los extractos de romero, expresadas en mg/Kg o mL/Kg, se muestran en la **Tabla N°13**, tomando en cuenta la cantidad de extracto (en mg o mL) presentes en 0,1 mL de producto y considerando que los ratones pesan 0,0257 Kg.

Tabla N°13: Dosis, en mL/Kg y mg/Kg, de aceite esencial, hidrolato y extracto de romero, en cada producto aplicado.

Grupo	Aceite Esencial (mL/Kg)	Extracto (mg/Kg)	Hidrolato (mL/Kg)
AE	0,19 mL/Kg	-----	-----
ER	-----	5,25 mg/Kg	-----
HR	-----	-----	3,89 mL/Kg
TC	0,19 mL/Kg	2,36 mg/Kg	1,05 mL/Kg
CH	0,001 mL/Kg	3,25 mg/Kg	1,55 mL/Kg

La aplicación de los productos se realizó de manera diaria, propiciándole a cada individuo 0,1mL (medidos con una micropipeta) del producto correspondiente y este se distribuyó adecuadamente con ayuda de los dedos. En el caso del champú, luego de su aplicación este se retiró con ayuda de un pañuelo húmedo.

La evaluación del crecimiento capilar de los ratones se realizó empleando dos escalas:

- 1) Una evaluación fotográfica al final de las semanas 1, 2, 3, 4 y 5. Para la cual se armó una caja de observación, que consistía en una caja sin tapa con las siguientes dimensiones: 15 cm de alto, 5 cm de ancho y 7 cm de profundidad. Dicha caja presentaba una abertura pequeña en su cara superior, la cual permitía el paso de la cola del animal. Esta caja tiene como función suspender al ratón en el aire, limitando su movimiento, facilitando así la toma de las fotografías sin necesidad de anestesiarse al individuo (Figura 29).

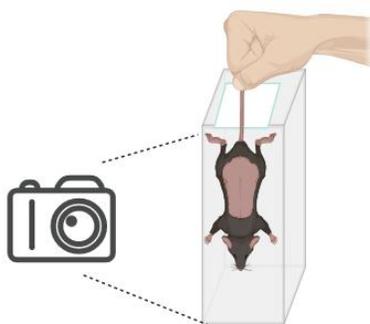


Figura 29. Representación de la caja de observación fabricada. En este método, se empleó la siguiente escala de puntaje:

Tabla N°14: Escala de puntaje de crecimiento capilar (Murata *et al.*, 2013).

Puntaje	% de Crecimiento
1	(0-20)%
2	(20-40)%
3	(40-60)%
4	(60-80)%
5	(80-100)%

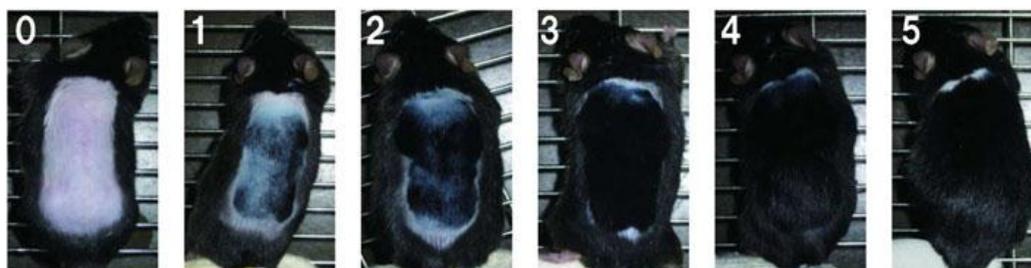


Figura 30. Puntuaciones para la evaluación del crecimiento capilar: 0= sin crecimiento; 1= menos del 20% de crecimiento, 2= 20% al 40% de crecimiento, 3= 40% al 60% de crecimiento, 4= 60% al 80% de crecimiento, 5= 80% al 100% de crecimiento (Murata *et al.*, 2013).

Con la finalidad de minimizar la subjetividad a la hora de evaluar el crecimiento capilar mediante este método, se procedió a cubrir la identificación y mover de ubicación, a cada una de las cajas, de manera tal que el investigador no conociera a que grupo pertenece cada animal evaluado.

2) Al final de las semanas 2, 3, 4 y 5; se tomó un mechón de pelos, por tracción, dentro de la zona afeitada, procurando que estos sean extraídos con sus respectivos folículos.

En la semana 5, tomo un mechón de pelos, por tracción, dentro y fuera de la zona afeitada, para ser comparados. Dicho procedimiento también se realizó con los ratones del grupo control-control.

Una vez obtenido el mechón de pelo, este se colocó sobre una superficie blanca (cartulina) y se procedió a separar los pelos aplicando fricción con la ayuda de los dedos. Luego, se procedió a seleccionar los pelos completos y separarlos de aquellos que estaban partidos o que no presentaban folículo piloso. Luego, se tomaron 10 de estos pelos y se pegaron sobre una cartulina blanca, a la cual se le había aplicado una fina capa de pegamento en barra, y una vez inmovilizados los pelos, se recubrieron con cinta adhesiva transparente (Figura 26). A cada ficha de pelos, se le identifico con el grupo del ratón, su número y la fecha de la obtención de la muestra.

La medición de longitud de estos pelos se realizó con la ayuda de una lupa de 6 dioptrías (aumento x6 de la imagen) y un vernier digital (marca DIGITAL CAPILPER) de una apreciación de 0,02 mm.

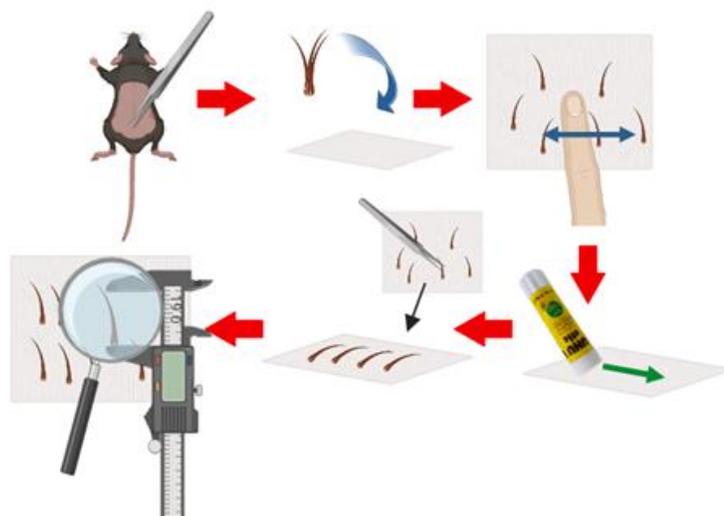


Figura 31. Procedimiento esquematizado de la medición de pelos obtenidos por tracción.

Al finalizar el ensayo en ratones, se continuó con el procedimiento de eutanasia de los mismos, que consistió inicialmente, en la aplicación de una inyección de una mezcla de ketamina/xilacina, pero a una dosis tres veces superior a la dosis anestésica (270 mg/Kg de ketamina + 15 mg/Kg de xilacina), con el objetivo de producir una sobredosis anestésica (HSUS, 2013).

Una vez alcanzada la inconsciencia, se introdujo al animal dentro de una cámara que contiene un algodón impregnado con halotano ($C_2HBrClF_3$), dicho compuesto desplaza el oxígeno dentro de los tejidos del animal, provocando parálisis y su posterior fallecimiento (HSUS, 2013).

Para asegurar el fallecimiento del animal, se procedió a causarle un neumotórax bilateral, por medio de una toracotomía bilateral por medio de una aguja, colapsando así su cavidad torácica del ratón y provocando su muerte (HSUS, 2013).

5.5.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el estudio fueron procesados en el paquete estadístico GraphPrism versión 8. Se utilizó la prueba de **Shapiro-Wilk** para observar la distribución normal de los datos.

Los resultados de las variables cuantitativas se presentaron con medidas de tendencia central en medidas de frecuencias, porcentajes y valores absolutos mediante gráficos. Para las diferencias de los valores medios, se utilizó la prueba **t de Student**, aceptando valores significativos inferiores a **p<0,050**.

En este sentido, para observar las diferencias entre los valores medios entre los distintos grupos se realizó una prueba de **ANOVA** de 1 vía para obtener el valor F de Fisher.

Para obtener las diferencias y valores comparativos entre cada grupo se realizó una prueba de ANOVA de 2 vías, considerando el factor de columna como el tratamiento y el factor de filas como los valores obtenidos entre las semanas del estudio.

A este análisis se le hizo una prueba Pos-Hoc bajo **el método de Tukey** para verificar las relaciones entre medias, considerando que cada medida fue tomada en tiempos diferentes. Los valores F significativos fueron aceptados por encima de 1, así como diferencias estadísticas con valores de **p<0,050**.

www.bdigital.ula.ve

Resultados y discusión

Esta última fase de la investigación (ensayo preclínico en ratones C57BL6//BIOU) se realizó siguiendo el protocolo explicado en el capítulo anterior (Procedimiento experimental). Es necesario acotar, que durante el procedimiento inicial de afeitado de los ratones, se observó que 3 individuos del grupo AD (agua destilada), presentaban un nevo melanocítico (lunar), que cubría toda la región dorsal del animal (**Figura 32**), el cual mostraba la misma coloración del pelo, dicho rasgo no se presentó en ningún otro ratón de los demás grupos de estudio (CC, AE, ER, HR, TC, CH y MXD).

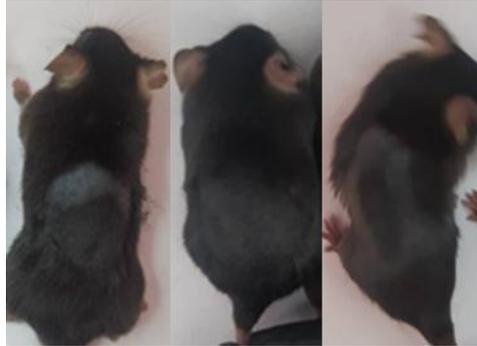


Figura 32. Ratones AD1, AD2 y AD3 que presentaban nevo melanocítico (lunar), en la región dorsal de su cuerpo.

Inicialmente, se pensó que dicha particularidad no traería ningún impacto en la evaluación capilar de estos individuos y estos no se descartaron debido que no se contaban con más ratones de la misma línea y edad. Sin embargo, los lunares demostraron tener un efecto negativo en la escala de crecimiento capilar y registro fotográfico al momento de obtener resultados. Por otro lado, no pareció afectar la metodología en la que se mide la longitud de los pelos arrancados.

6.1. Registro fotográfico y escala de crecimiento capilar:

Los resultados mostrados en la **Figura 33**, ilustran la progresión del crecimiento capilar, con respecto al tiempo, desde la semana 0 hasta la semana 5. Después del afeitado (semana 0), se percibe que todos los ratones C57BL6//BIOU presentan una coloración rosada en su piel (a excepción de 3 individuos del grupo AD).

La estimulación del crecimiento capilar se evaluó observando el oscurecimiento en el color de la piel, de un rosa vivo a un color gris/negro, los cuales son indicativos del paso de la fase telógena (descanso) a fase anágena (crecimiento activo) de los folículos pilosos de la zona afeitada (Oh *et al.*, 2014).

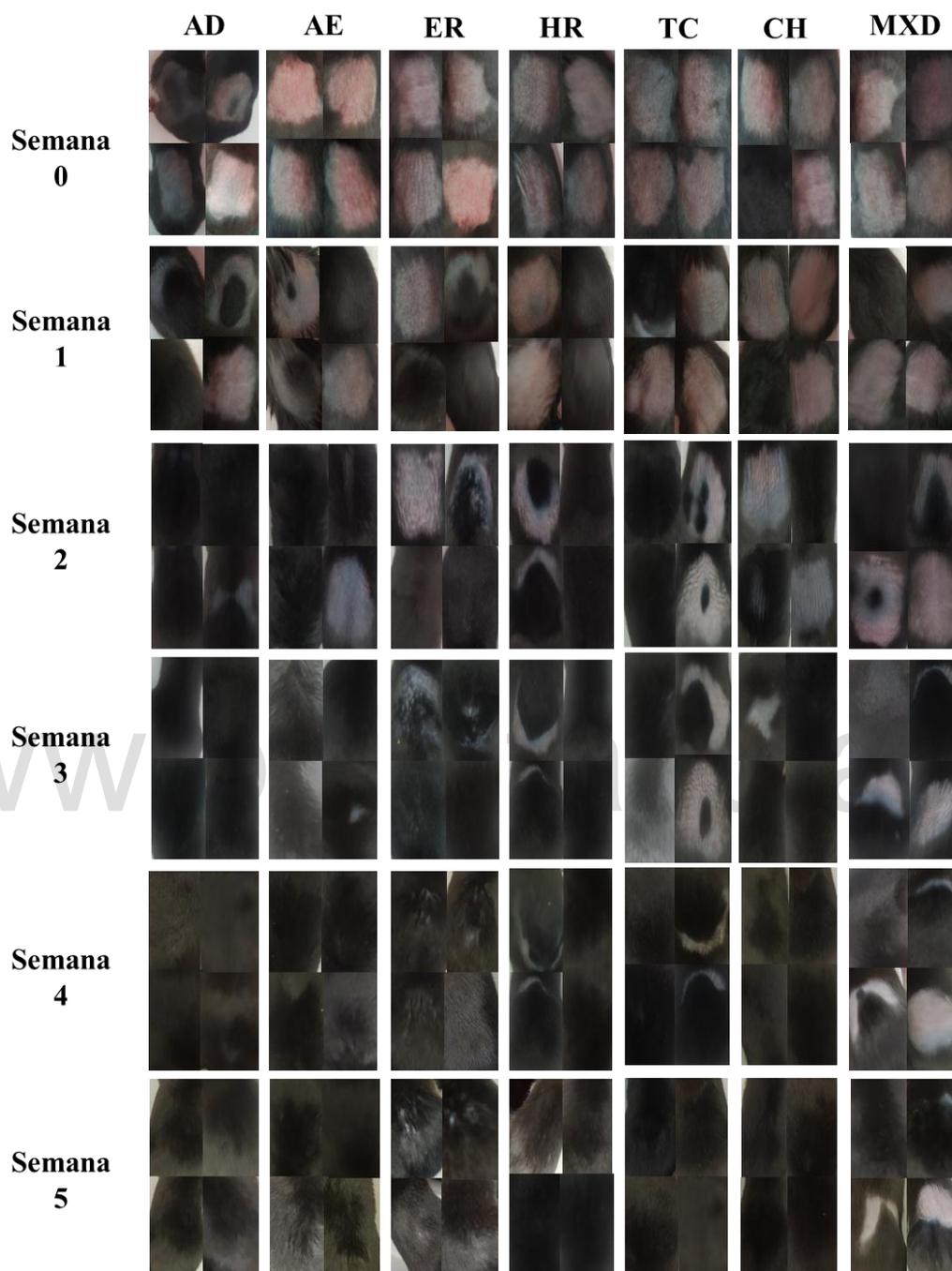


Figura 32. Observación macroscópica de la región dorsal de los ratones C57BL6//BIOU. AD (agua destilada), AE (aceite esencial de romero al 5%), ER (extracto de romero al 5%), HR (hidrolato de romero), TC (tónico capilar), CH (champú) y MXD (minoxidil al 5%).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Durante todo el estudio, no se observaron efectos adversos debidos a la aplicación de los productos por vía tópica como: irritación, descamación o señales conductuales que indiquen malestar en los ratones (barbering, acicalamiento excesivo o inapetencia).

A partir de la semana 2, se puede observar que la piel de la mayoría de los individuos de los grupos AD, AE, ER, HR, TC y CH pasó de un color rosado a una tonalidad gris/negro, lo cual se traduce en un crecimiento considerable del pelo en estos grupos. Por otro lado, solo la mitad de los individuos del grupo MXD presentaban dicho fenómeno.

En la semana 4, todos los ratones de los grupos AD, AE, HR, TC y CH, mostraron tener un crecimiento capilar considerable (puntaje entre 3,5 y 5 en la escala), mientras que el grupo MXD aún presentaban grandes zonas de piel sin pelo (un puntaje de 2), siendo este el grupo que presentó menor crecimiento capilar.

Al final de la semana 5, se puede observar que todos los ratones de los grupos AD, AE, HR, TC y CH, recuperaron prácticamente todo el pelo de la región afeitada (puntaje entre 4,75 y 5), mientras que en el grupo MXD solo dos individuos lograron recuperar todo su pelaje, resultando en un puntaje promedio de 3,75.

La **Tabla N°15** muestra, la media grupal, del puntaje en el crecimiento capilar de todos los grupos, a lo largo de las 5 semanas del ensayo. Nótese que, si bien es cierto que los puntajes de la escala de crecimiento se expresan en números enteros, se consideró más adecuado expresarlos en con números decimales, en función el promedio de los puntajes de cada grupo, observándose esta forma de expresar los resultados en otras investigaciones similares (Oh *et al.*, 2014, Murata *et al.*, 2013).

Tabla N°15: Media grupal en la escala de crecimiento capilar de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; de la semana 1 a la 5.

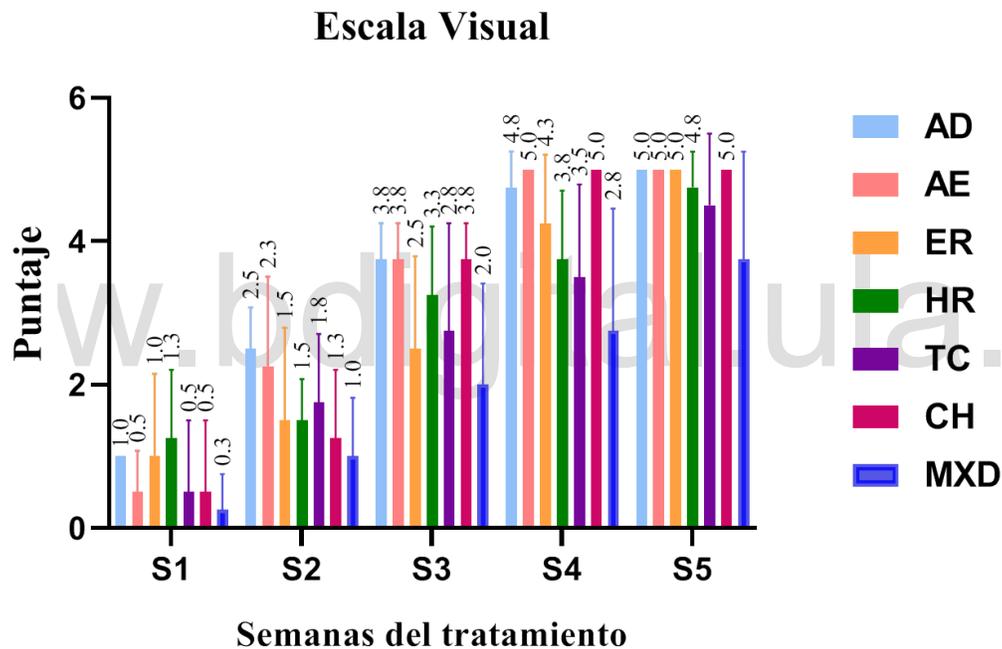
Grupo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
AD	1	2,5	3,75	4,75	5
AE	0,5	2,25	3,75	5	5
ER	1	1,5	2,5	4,25	5
HR	1,25	1,5	3,25	3,75	4,75
TC	0,5	1,75	2,75	3,5	4,5
CH	0,5	1,25	3,75	5	5
MXD	0,25	1	2	2,75	3,75

De manera general, entre las semanas 1 y 5, se observó un crecimiento notable en el pelo de los ratones de los grupos AD, AE, ER, TC y CH; en donde estos recuperaron entre un 70%-100% del pelo al finalizar la semana 4, exhibiendo un crecimiento mayor que el del grupo MXD (**Gráfico N°1**).

Por su parte, el grupo MXD fue el que presentó un menor crecimiento capilar según esta escala, en donde se puede observar que ocupó el último lugar al final de todas las semanas de estudio, el promedio de los ratones de este grupo solo logró recuperar, aproximadamente, el 75% de su pelaje al final de la semana 5.

Los grupos AE y CH demostraron ser los tratamientos que estimularon el crecimiento capilar con mayor rapidez, ya que los ratones pertenecientes a estos grupos recuperaron todo su pelaje al final de la semana 4.

Gráfico N°1: Comparación del efecto del crecimiento capilar, mediante la escala de puntaje, en ratones C57BL6//BIOU luego de la aplicación tópica de agua destilada (AD), aceite esencial al 5% (AE), extracto de romero al 5% (ER), hidrolato de romero (HR), tónico capilar (TC), champú (CH) y minoxidil al 5% (MXD).



La escala visual, en conjunto con el registro fotográfico, demuestran que los tratamientos que contienen derivados del romero (aceite esencial, extracto o hidrolato) inducen el crecimiento capilar mediante la rápida estimulación de la fase anágena en el crecimiento del pelo (cambio de color rosa a gris/negro en la piel) (Oh *et al.*, 2014).

Sin embargo, es contradictorio que el grupo AD, siendo el control negativo, presentara un aparente crecimiento capilar similar (en comparación al grupo AE y CH) o inclusive superior (en comparación a los grupos ER, HR, TC y MXD) que otros tratamientos. Esta discrepancia es

fácilmente explicada por el tipo de metodología empleada (una escala cualitativa) y el hecho que 3 de los ratones de este grupo presentaban lunares dentro de la zona afeitada (Figura 26).

Se debe recordar que, en esta escala de crecimiento, se evalúa la recuperación del pelo en la zona afeitada en función del oscurecimiento de dicha zona, o en otras palabras, la aparición de una coloración gris/negra sobre la piel afeitada de color rosa intenso. Es en este punto en donde se puede evidenciar el impacto que tienen los lunares sobre este método de evaluación, ya que el lunar al ser del mismo color del pelo del animal, puede dar la impresión de que existe un crecimiento capilar cuando realmente no es así, lo que se traduce en un puntaje considerablemente mayor al valor real.

Por esta razón, los estudios de crecimiento capilar en ratones C57BL/6 se valen de métodos adicionales como software de análisis de imágenes (Imagen J o Leica LAS Image Analysis), análisis histológicos (estudios de papila dérmica), bioquímicos (fosfatasa alcalina, DTH en piel o sangre, PCR, Wester Blot, entre otros), o la medición de pelos arrancados; los cuales permiten realizar una evaluación del crecimiento capilar mucho más objetiva (Baek *et al.*, 2023; Oh *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2022).

6.2. Medición de la longitud del pelo:

A continuación, la **Tabla N°16** muestra los valores descriptivos (longitud del pelo) de todos los grupos de estudio entre las semanas 2 y 5, obtenidos del registro de 1280 pelos recolectados a lo largo del estudio.

Tabla N°16: Valores de longitud del pelo (en mm), de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; entre las semanas 2 y 5.

	AD	AE	ER	HR	TC	CH	MXD
	Muestra						
	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4
	Longitud del pelo (mm):						
Mínimo	2,74	4.810	4,221	4,913	3,872	3,016	2,460
Máximo	5,553	6,716	6,347	6,696	6,517	6,645	5,454
Rango	2.813	1.907	2,126	1,784	2,645	3,629	2,995
Promedio (\bar{X})	4,237	6,085	5,400	6,087	5,727	5,286	3,981
Desviación Estándar (\pm SD)	1,173	0,8943	0,9814	0,8281	1,259	1,731	1,356
Coefficiente de Variación (%)	27,69	14,70	18,17	13,61	21,99	32,75	34,07

Mínimo: valor mínimo registrado. **Máximo:** valor máximo registrado. **Rango:** diferencia entre el valor mínimo y máximo.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

En dicha tabla se muestran diversos parámetros estadísticos como el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación; nótese que los dos últimos son elevados. Sin embargo, esta discrepancia se debe a que estos datos corresponden a todos los pelos recolectados entre las semanas 2 y 5; por consiguiente, es de esperarse que, con el paso del tiempo, la longitud de los pelos aumente, haciendo que los datos se dispersen entre sí, lo que es totalmente normal considerando el contexto de este estudio. Incluso, una desviación estándar y coeficiente de variación bajos, indicarían que los valores de longitud son similares en el tiempo, interpretándose como la inexistencia de crecimiento capilar, fenómeno que no debería presentarse en la realidad.

A continuación, en los gráficos N°1 y N°2, se muestra la comparación del crecimiento capilar entre la semana 2 y 5, en forma de gráficos de columna y cajas.

Gráfico N°2: Comparación en el crecimiento capilar (medido en mm) en forma de columnas, de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; entre las semanas 2 y 5.

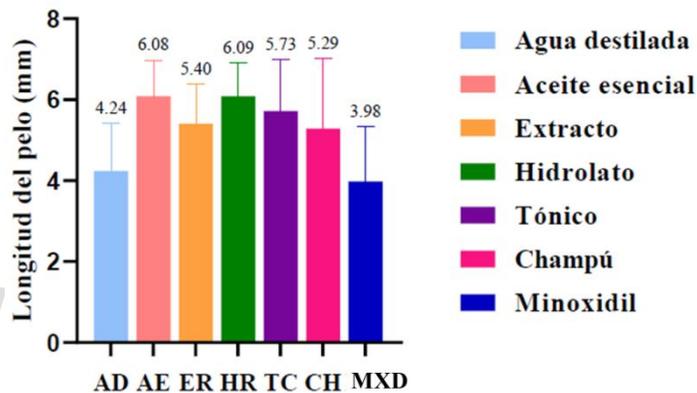
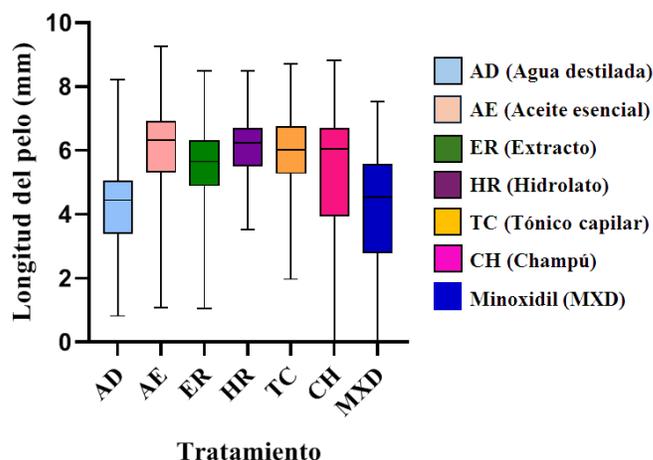


Gráfico N°3: Comparación en el crecimiento capilar (medido en mm) en forma de cajas, de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD; entre las semanas 2 y 5.



Inicialmente, en ambas gráficas se observa que los grupos que presentaron una mayor longitud de pelo en promedio, parecen ser los grupos de aceite esencial (AE) e hidrolato (HR); mientras que los que presentaron un menor crecimiento fueron los grupos de agua destilada (AD) y minoxidil al 5% (MXD). Sin embargo, es necesario realizar pruebas estadísticas que permitan determinar si existen diferencias reales en el crecimiento capilar de los distintos grupos.

Para poder realizar una prueba de ANOVA, y determinar si el crecimiento es diferente entre los grupos, es necesario que los datos de los grupos presenten una distribución normal. Para esto, se procedió a realizar una prueba de **Shapiro-Wilk** para los datos de longitud de cada grupo de estudio, usando como valor crítico un nivel de confianza del 95% ($\alpha= 0,05$) para rechazar o aceptar las siguientes hipótesis:

- **H₀ → p-valor > 0,05.** Los datos se ajustan a una distribución normal.
- **H₁ → p-valor < 0,05.** Los datos **NO** se ajustan a una distribución normal.

En el hipotético caso, de que los datos no presenten una distribución normal, será necesario hacer uso de métodos estadísticos no paramétricos, los cuales permitirían analizar la varianza de los datos sin la necesidad de que estos presenten una distribución normal.

Ahora, en la **Tabla N°17** se muestran los valores de **W** y **p** de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD durante todo el estudio.

Tabla N°17: Prueba de normalidad de **Shapiro-Wilk** para los datos de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD entre las semanas 2 y 5.

	AD	AE	ER	HR	TC	CH	MXD
Prueba Shapiro-Wilk							
W	0,9893	0,8245	0,9304	0,8423	0,7596	0,8654	0,9561
p-valor	0,9538	0,1539	0,5970	0,2022	0,0673	0,2800	0,7545
Normalidad	Si						

Nota: se comprueba la normalidad de los datos sí **p-valor>0,05**.

En dicha tabla, los valores de p obtenidos son mayores que el valor crítico (**p-valor > 0,05**) en todos los casos, por consiguiente, se concluye que los datos de longitud de pelo en todos los grupos de estudio se ajustan a una distribución normal.

Se debe acotar que, el p-valor es un coeficiente de correlación para el modelo de distribución normal, siendo este equivalente al coeficiente de correlación (R^2) que se emplea en las curvas de calibración. Por consiguiente, mientras estos valores (p-valor) sean más similares a 1, los datos se ajustan más al modelo de normalidad (Tapia *et al.*, 2021). Incluso, si el p-valor es multiplicado por 100, se obtiene la probabilidad de que dicho conjunto de datos provenga de una distribución normal, siendo un p-valor de 1 el equivalente a una probabilidad del 100% de que los

datos provengan de una distribución normal. Sin embargo, se debe aclarar que este último caso es muy poco probable en escenarios reales.

Considerando lo descrito en el párrafo anterior, se puede afirmar que los grupos que presentaron un mayor ajuste a una distribución normal fueron los grupos AD y MXD. Esto puede deberse a que el promedio y desviación estándar de estos grupos es, relativamente menor, en comparación a los demás grupos, lo cual causa que el valor de p tienda a 1.

Una vez comprobada la normalidad de los datos, se realizó una prueba de ANOVA de una vía, usando como valor crítico un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$) para rechazar o aceptar las siguientes hipótesis:

- $H_0 \rightarrow p\text{-valor} > 0,05$. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos.
- $H_1 \rightarrow p\text{-valor} < 0,05$. Al menos una de las medias de los grupos es estadísticamente diferente a las demás.

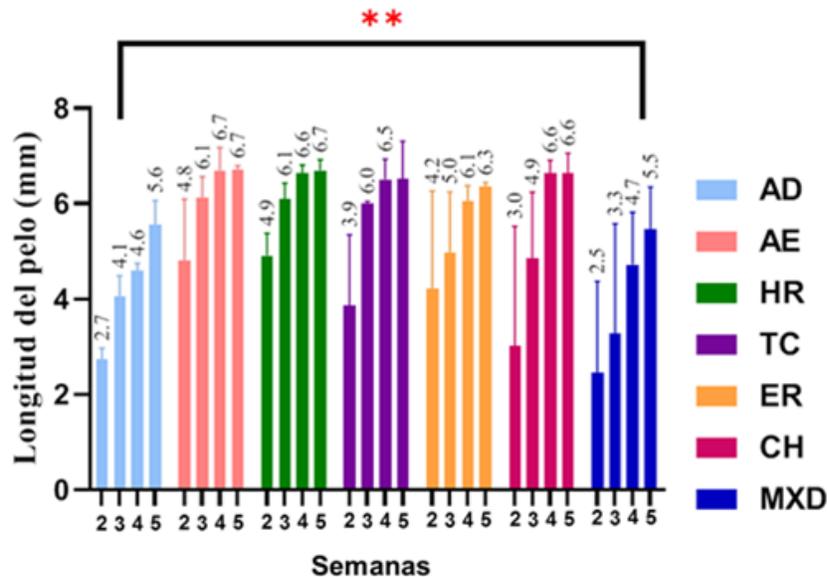
A continuación, en la **Tabla N°18**, se muestran los resultados de la prueba ANOVA para los datos de longitud de los pelos arrancados de todos los grupos de estudio, para un valor crítico de 0,05.

Tabla N°18: Resultados de la prueba ANOVA de una vía, de la comparación del largo del pelo de todos los grupos de estudio.

	SS	DF	MS	Valor de F	Valor de P
Entre grupos	17,14	6	2,587	17,11	0,0026
Dentro de los grupos	27,14	3	9,246	55,37	
Residual	3,006	18	0,1670		
Total	47,88	27			

SS: suma de cuadrados. **DF:** grados de libertad. **MS:** media de los cuadrados. **Nota:** existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos sí $p < 0,05$.

Gráfico N°4: Resultados de la prueba ANOVA de la longitud del pelo de los grupos AD, AE, ER, HR, TC, CH y MXD, en las semanas 2 y 5. El resultado de la prueba se indica con (**), el cual expresa que $p \leq 0,05$.



En dicha tabla, se puede observar que el valor del estadístico p es de 0,0026 ($p=0,0026$), por lo tanto se aprueba la H_1 , lo que significa que, la media de al menos de uno de los grupos de estudio es estadísticamente diferente a las demás.

Sabiendo esto, se procedió a comparar cada una de las medias de los grupos de tratamiento (AE, ER, HR, TC y CH) con respecto a los grupos AD y MXD, empleando la **prueba de Tukey**. Con esta prueba, se generó un valor de p para cada comparación usando como valor crítico un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$) para rechazar o aceptar las siguientes hipótesis:

- $H_0 \rightarrow p\text{-valor} > 0,05$. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambos grupos.
- $H_1 \rightarrow p\text{-valor} < 0,05$. Existen diferencias estadísticamente significativas en la media de los tratamientos con respecto al grupo AD o MXD.

La aprobación de la hipótesis nula (H_0) se puede interpretar como la inexistencia de diferencias en el crecimiento capilar del tratamiento con respecto al grupo AD o MXD (o incluso ambos). Mientras que la aprobación de la hipótesis alterna (H_1) se interpreta como que el crecimiento capilar de los grupos de tratamiento es significativamente mayor (debido a que el promedio de crecimiento es mayor en todos los casos) con respecto al grupo AD o MXD (o incluso ambos).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Los resultados de esta prueba se reflejan en la **Tabla N°19**, en esta se muestran los valores de p, para todos los tratamientos además se puede observar que estos son menores al valor crítico ($p < 0,05$).

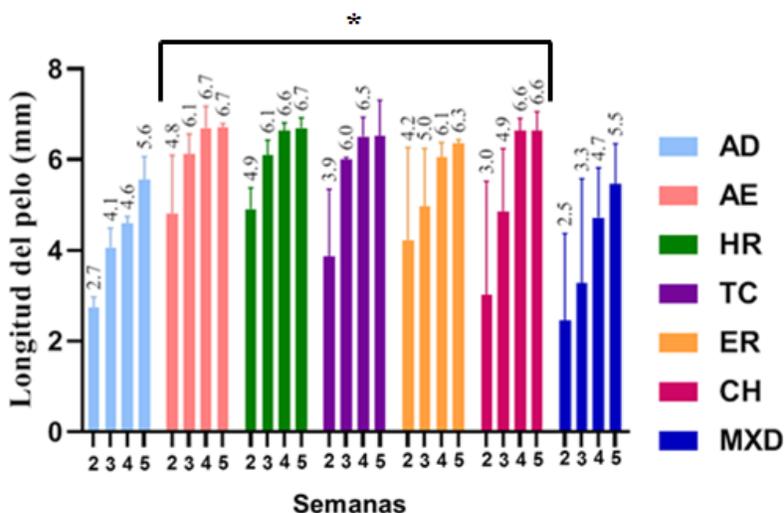
Tabla N°19: Prueba de ANOVA con análisis *post-Hoc* bajo la **prueba de Tukey** de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, asumiendo como HDS a los grupos AD y MXD.

Estímulo Evaluado	Valor de p	
	Agua Destilada (AD)	Minoxidil al 5% (MXD)
AE	0,0039*	0,0079*
ER	0,0075*	0,0057*
HR	0,0044*	0,0086*
TC	0,0015*	0,0036*
CH	0,0047*	0,0203*

Nota: el símbolo (*) indica que $p < 0,05$, y se aprueba la H_1 .

En la tabla anterior, se puede observar que los p valores obtenidos en cada comparación son menores que el valor crítico ($p < 0,05$), y por consiguiente, se puede afirmar que el crecimiento capilar de todos los grupos es significativamente mayor al de los grupos AD y MXD.

Gráfico N°5: Prueba de ANOVA con análisis *post-Hoc* bajo la **prueba de Tukey** de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, asumiendo como HDS a los grupos AD y MXD. El símbolo (*) indica que la media del grupo presenta diferencias estadísticamente significativas con los grupos AD y MXD ($p < 0,05$).



Por su parte, el poco crecimiento capilar que presento el grupo MXD puede deberse a la falta de eficacia ocasional que puede presentar el fármaco minoxidil, fenómeno que ha sido reportado tanto en roedores como en humanos en distintas investigaciones (Naranjo *et al.*2020;

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Suchonwanit *et al.*, 2019). Siendo una posible causa, la rápida estimulación del ciclo de crecimiento de los folículos hacia la fase telógena, y posteriormente, anágena; provocando un retraso en el crecimiento capilar, especialmente en las primeras semanas del tratamiento (Suchonwanit *et al.*, 2019)

Ahora bien, sabiendo que todos los tratamientos estimulan el crecimiento capilar en mayor medida que el agua destilada y el minoxidil, se procederá a determinar cuál de estos tratamientos es el mejor. Para esto, se procedió a realizar nuevamente un test de ANOVA, pero comparando únicamente a los grupos AE, ER, HR TC y CH, usando como valor crítico un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$) para rechazar o aceptar las siguientes hipótesis:

- **H₀ → p-valor > 0,05.** No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos.
- **H₁ → p-valor <0,05.** Al menos una de las medias de los grupos es estadísticamente diferente a las demás.

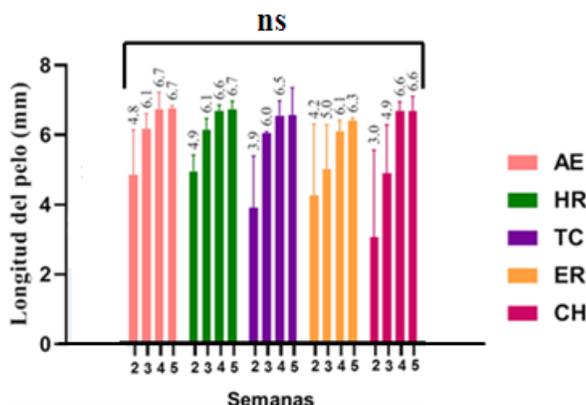
A continuación, en la **Tabla N°20**, se muestran los resultados de la prueba ANOVA para los datos de longitud de los pelos arrancados de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, para un valor crítico de 0,05.

Tabla N°20: Resultados de la prueba ANOVA de una vía, de la comparación del largo del pelo de los grupos AE, ER, HR, TC y CH.

	SS	DF	MS	Valor de F	Valor de P
Entre grupos	88,78	4	22,19	9,02	0,32
Dentro de los grupos	1954,67	795	2,45	2,38	
Residual	5,26	20	0,1670		
Total	2043,4	799			

En dicha tabla, se puede observar que el valor de p es mayor que el valor crítico (**p-valor > 0,05**), por lo tanto se aprueba la H₁ y se determina que no existen diferencias estadísticamente significativas, en el crecimiento capilar, entre los grupos AE, ER, HR, TC y CH. Sin embargo, se puede tener una estimación inicial al observar detalladamente el **Gráfico N°3**, en donde se observa que el grupo AE es el que presenta un mayor crecimiento capilar debido a su posición en la gráfica, pero para afirmar esto, es necesario aumentar el tamaño de la muestra para verificar esta hipótesis con su correspondiente análisis estadístico.

Gráfico N°6: Resultados de la prueba ANOVA de la longitud del pelo de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, en las semanas 2 y 5. El resultado de la prueba se indica con (ns), el cual expresa que $p > 0,05$.



Ahora, para determinar en cual semana se presenta un mayor crecimiento capilar, se procedió a comparar la media de longitud de todos los grupos en cada una de las semanas de estudio, mediante la **prueba de Tukey**. La comparación se realizó de la siguiente manera: semana 2 vs semana 3, semana 3 vs semana 4 y semana 4 vs semana 5; considerando las siguientes hipótesis:

- $H_0 \rightarrow p\text{-valor} > 0,05$. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambos grupos.
- $H_1 \rightarrow p\text{-valor} < 0,05$. Existen diferencias estadísticamente significativas en la media de los grupos.

Ahora, en la **Tabla N°21** se muestran los resultados de la prueba de comparación múltiple de **Tukey** de los grupos AE, ER, HR, TC y CH.

Tabla N°21: Prueba de comparación múltiple de **Tukey** para los grupos AE, ER, HR, TC y CH; entre las semanas 2 y 5.

	Diferencia Media	Valor de p (Ajustado)	Diferencia Estadística
semana 2 vs semana 3	-1,340	<0,0001	Si
semana 3 vs semana 4	-0,9191	<0,0001	Si
semana 4 vs semana 5	-0,2981	0,1219	No

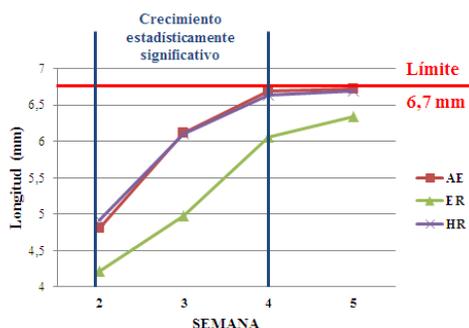
Nota: se considera que existe diferencia estadística si el valor de p es menor a 0,05 ($p < 0,05$).

En dicha tabla, se puede detallar que el crecimiento capilar es significativo entre las semanas 2 y 4 ($p\text{-valor} < 0,05$). Mientras que entre las semanas 4 y 5, el crecimiento capilar no es estadísticamente diferente ($p\text{-valor} > 0,05$).

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Este fenómeno entre las semanas 4 y 5, se debe a los pelos de dichas semanas están cerca de alcanzar su máximo de longitud (aproximadamente 6,7 mm), razón por la cual, el crecimiento capilar es mínimo, o inclusive, inexistente. Esto se puede observar con mayor claridad si se muestra dicho crecimiento en una gráfica de línea (**Gráfica N°7**), en la cual se aprecia que el crecimiento capilar es considerable (estadísticamente significativo) entre las semanas 2 y 4, y cuando la longitud se aproxima a 6,7 mm (en la semana 5), la gráfica se aplana, y es en este punto donde el crecimiento se detiene (no es estadísticamente significativo).

Gráfica N°7: Crecimiento capilar (en mm) de los grupos AE, ER y HR entre las semanas 2 y 5. Nótese, que la gráfica se aplana cuando el valor de la longitud se aproxima al límite de crecimiento capilar.



A continuación, los datos de longitud del pelo, dentro (DA) y fuera (FA) del área afeitada, de los grupos AE, ER, HR, TC y CH se muestran en la **Tabla N°22**.

Tabla N°22: Datos de longitud (en mm) de los pelos dentro y fuera del área, de los ratones de los grupos AE, ER, HR, TC y CH; en la semana 5.

		AE	ER	HR	TC	CH
		Muestra				
		N= 4/4	N= 4/4	N= 4/4	N= 4/4	N= 4/4
Mediciones de Longitud del Pelo (mm):						
Mínimo	DA	6,619	6,256	6,384	5,444	6,258
	FA	6,405	6,490	6,499	6,558	6,522
Máximo	DA	6,808	6,454	6,912	7,298	7,073
	FA	4,723	6,733	6,685	6,666	6,660
Rango	DA	0,189	0,198	0,528	1,854	0,815
	FA	0,318	0,243	0,186	0,108	0,138
Promedio (\bar{X})	DA	6,716	6,347	6,696	6,517	6,645
	FA	6,617	6,601	6,602	6,605	6,602
Desviación estándar (\pmSD)	DA	0,082	0,094	0,224	0,793	0,410
	FA	0,149	0,113	0,077	0,050	0,057

DA: dentro del área afeitada; **FA:** fuera del área afeitada. **SS:** suma de cuadrados. **DF:** grados de libertad. **MS:** media de los cuadrados. **Nota:** existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos sí $p < 0,05$.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

Se comparó la longitud de los pelos dentro y fuera de la zona afeitada de cada uno de los ratones de los grupos de estudio AE, ER, HR, TC y CH; al final de la semana 5, mediante una prueba ANOVA. Los resultados de esta prueba se muestran en la **Tabla N°23**.

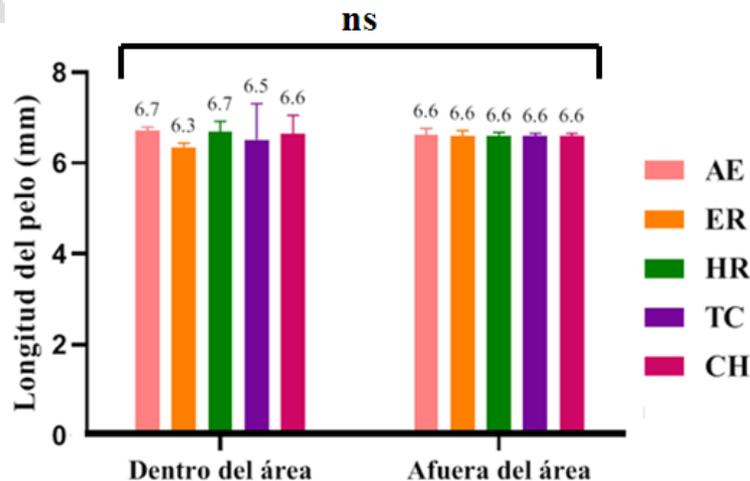
Tabla N°23: Resultados de la prueba ANOVA de una vía, en la comparación de la longitud del pelo dentro y fuera del área afeitada de los ratones de los grupos AE, ER, HR, TC y CH.

	SS	DF	MS	Valor de F	Valor de P
Entre grupos	0,8506	4	0,1418	0,9240	0,5126
Dentro de los grupos	0,3974	1	0,3974	2,590	
Residual	0,9205	4	0,1670		
Total	2,168	13			

SS: suma de cuadrados. DF: grados de libertad. MS: media de los cuadrados. Nota: existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos sí $p < 0,05$.

En dicha tabla, se puede conemplar que el p valor es mayor que el valor crítico ($p > 0,05$), por lo tanto se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas en la longitud del pelo dentro y fuera del área afeitada en la semana 5.

Gráfica N°8: Comparación de la longitud del pelo dentro y fuera del área afeitada, de los grupos AE, ER, HR, TC y CH, al final de la semana 5.



Luego, se comparó la longitud del pelo dentro de la zona afeitada de los ratones de los grupos AE, ER, HR, TC y MXD con pelos tomados de los ratones del grupo control-control (CC), Estos datos se muestran en la **Tabla N°24**.

Esta comparación se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía, comparando la media del grupo CC con los demás grupos (AE, ER, HR, TC y CH), estos resultados se ven reflejados en la **Tabla N°24**.

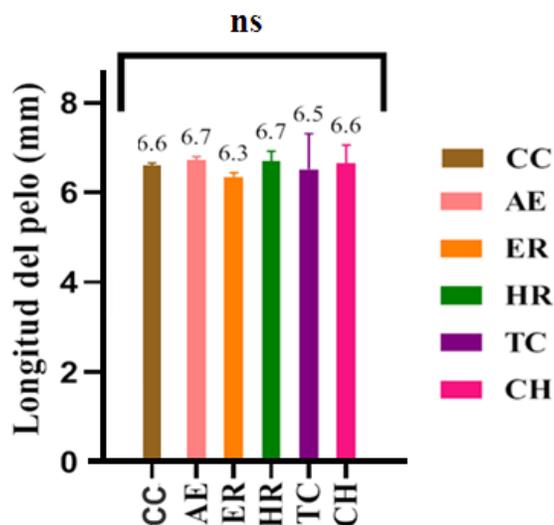
Tabla N°24: Datos de longitud (en mm) de los pelos dentro de la zona afeitada de los grupos AE, ER, HR, TC y CH; y de los ratones del grupo CC.

	AE	ER	HR	TC	CH	CC
	Muestra					
	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4	N=4
Longitud del pelo (mm):						
Mínimo	6,619	6,256	6,384	5,444	6,258	6,55
Máximo	6,808	6,454	6,912	7,298	7,073	6,663
Rango	0,18	0,19	0,52	1,85	0,81	0,11
Promedio (\bar{X})	6,71	6,34	6,69	6,51	6,64	6,60
Desviación Estándar (\pmSD)	0,082	0,0094	0,224	0,793	0,410	0,050
Valor de p	0,164	0,489	0,539	0,835	0,866	-----

Mínimo: valor mínimo registrado. **Máximo:** valor máximo registrado. **Rango:** diferencia entre el valor mínimo y máximo.

En esta tabla, se obtiene que, el p valor es mayor que el valor crítico ($p > 0,05$) en todos los casos, aprobándose así la H_0 , esto quiere decir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el largo del pelo de los grupos tratados con respecto al grupo control-control, ya que este logro alcanzar su máxima longitud.

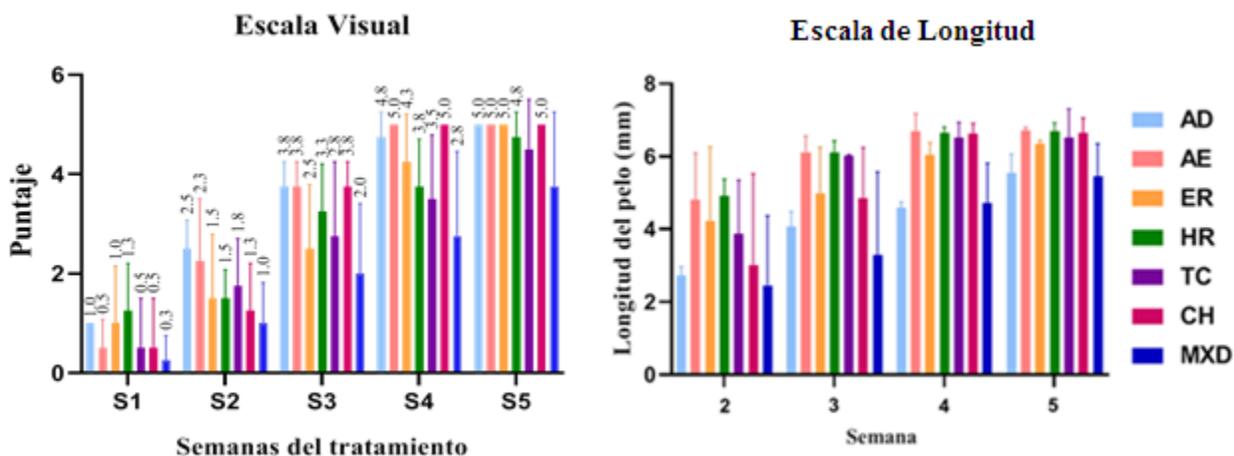
Gráfica N°9: Comparación de la longitud del pelo (en mm) de los grupos tratados (AE, ER, HR, TC y CH) con respecto al grupo CC. El símbolo (ns) señala que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.



Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

Finalmente, si se comparan las gráficas de crecimiento capilar de los métodos 1 y 2, se podrá observar una gran discrepancia con respecto al grupo AD (agua destilada). En la **Gráfica N°10** se muestra una comparación de las gráficas de crecimiento capilar (por semana) de todos los grupos.

Gráfica N°10: Comparación del crecimiento con el método 1 (escala de crecimiento) y método 2 (medición de pelos).



En esta comparación se puede observar que el crecimiento capilar de los grupos es similar entre ambos métodos, a excepción del grupo AD, ya que en el método 1 (escala de puntaje) este es uno de los grupos que presenta mayor crecimiento capilar. Por el contrario, en el método 2 (longitud de pelo) fue uno de los grupos con menor crecimiento.

Esta discrepancia en torno al grupo AD, se debe a la susceptibilidad del método 1 a malinterpretar los lunares como crecimiento capilar, cuando esto no es cierto. Se debe recordar que, en el grupo AD se presentaron 3 individuos con nevo melanocítico (lunar) (**Figura 32**) el cual altera significativamente el puntaje de estos ratones, haciendo que el promedio del crecimiento capilar de este grupo sea considerablemente mayor en este método. Por lo tanto, se puede intuir que este método de evaluación solo es adecuado cuando se emplea ratones sin nevo melanocítico.

Por otro lado, el método 2 demostró ser más objetivo y consistente con respecto a lo que se esperaba del crecimiento capilar del grupo AD, ya que en este método dicho grupo fue uno de los que presento un menor crecimiento capilar, lo cual tiene sentido considerando que es el grupo de control negativo.

Conclusiones

- Se logró la obtención del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) al 2,7% de pureza, mediante extracción en Soxhlet con etanol al 70%. Obteniéndose un rendimiento del 3,7%.
- Se formuló y elaboró un tónico capilar y champú que contenían aceite esencial, extracto e hidrolato de romero; en las siguientes proporciones:
 - ✓ Tónico: 5% de aceite esencial (al 98% v/v), 27% de hidrolato de romero, 5% de extracto de romero (al 2,7%) y 63% de otros ingredientes.
 - ✓ Champú: 0,004% de aceite esencial (al 98% v/v), 40% de hidrolato de romero, 3,1% de extracto de romero al (52,7%) y 56,86% de otros ingredientes.
- Del ensayo en ratones C57BL6//BIOU se desglosan las siguientes conclusiones:
 - ✓ El registro fotográfico demostró un crecimiento capilar considerable en los grupos que contenían extractos derivados del romero (AE, ER, HR, TC y CH).
 - ✓ La escala de crecimiento capilar mostró que los grupos AD, AE, ER, HR, TC y CH; fueron los grupos que presentaron un mayor crecimiento capilar al finalizar el estudio.
 - ✓ Los grupos AD, AE, ER, HR, TC y CH lograron recuperar, aproximadamente, entre el 95% y 100% de su pelaje al finalizar el estudio. Por el contrario, el grupo MXD solo recuperó solo el 75% aproximadamente.
 - ✓ Los tratamientos de los grupos AD, AE, ER, HR, TC y CH; demostraron estimular el crecimiento capilar, en mayor medida, que el grupo tratado con minoxidil al 5%
 - ✓ La escala de crecimiento capilar demostró serias limitaciones a la hora de evaluar ratones con nevo melanocítico (lunar) en la región afeitada, alterando el puntaje de los ratones del grupo AD.
 - ✓ La medición de pelos arrancados demostró, estadísticamente hablando, que los extractos de romero (en los grupos AE, ER, HR, TC y CH) estimulan el crecimiento capilar en los ratones C57BL6//BIOU.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

- ✓ No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento capilar entre los grupos AE, ER, HR, TC y CH.
- ✓ Se demostró, que no existen diferencias estadísticamente significativas, en la longitud de los pelos de los grupos tratados (AE, ER, HR, TC y CH), en comparación de los pelos fuera de la zona afeitada y de los ratones del grupo control-control (CC).
- ✓ Se determinó que el método 2 (longitud de pelo) es más objetivo y consistente, en comparación al método 1 (escala visual), al evaluar el crecimiento capilar en ratones que presentan nevo melanocítico (lunar).
- ✓ Se demostró que los tratamientos empleados en esta investigación (aceite esencial, hidrolato, extracto, tónico capilar y champú) estimulan en mayor medida, el crecimiento capilar que el fármaco comercial minoxidil.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

- Aumentar el tamaño de la muestra para determinar si existen diferencias, estadísticamente significativas, en el crecimiento capilar de los distintos tratamientos.
- Estudiar el efecto sobre el crecimiento capilar que pueden tener todas las posibles combinaciones entre aceite esencial, extracto e hidrolato; mediante un diseño experimental factorial.
- Estudiar el efecto sobre el crecimiento capilar que pueden tener los extractos empleados en esta investigación, en concentraciones distintas.
- En caso de presentar ratones con melanocítico (lunar), descartar a estos individuos, o en su defecto, repartirlos equitativamente entre los demás grupos.
- Emplear un software de análisis de imágenes, para evaluar con mayor objetividad el crecimiento capilar en la escala visual.
- Emplear métodos histológicos (papila dérmica) y bioquímicos (testosterona, DTH, enzima 5aR, entre otros) para entender con mayor profundidad los mecanismos de acción que tienen estos extractos sobre el crecimiento capilar.
- Repetir este ensayo en ratones C57BL/6 tratados con testosterona, para evaluar el potencial de estas sustancias en el tratamiento de la alopecia androgénica.

Referencias bibliográficas

1. ALBUS, U. (2012). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals** (8th Ed). The National Academies Press. Washington, DC.USA.
2. AMARAL, G. M., DE-CARVALHO, N. R., BARCELOS, R. P., DOBRACHINSKI, F., DE-LIMA-PORTELLA, R., DA-SILVA, M. H., LUGOKENSKI, T. H., MUNDSTOCK-DIAS, G. R., DA-LUZ, S. C., BOLIGON A. A., ATHAYDE, M. L., VILLETI, M. A., SOARES, F. A. & FACHINETTO, R. (2013) Protective Action of Ethanolic Extract of *Rosmarinus officinalis* L in Gastric Ulcer Prevention Induced by Ethanol in Rats. *Food Chem. Toxicol.*, **55**, 48-55.
3. ANDRADE, J. M., FAUSTINO, C., GARCIA, C., LADEIRAS, D., REIS, C. P. & RIJO, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: An Update Review of its Phytochemistry and Biological Activity. *Fut. Sci. OA*, **4**, FSO283.
4. ARANGURI CAMACHO, D. W. & RAMOS VILLANUEVA, R. L. (2016). Identificación de Formaldehído en Productos Cosméticos para Lacedos Expendidos en la Ciudad de Trujillo. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú
5. AVILA-SOSA, R., NAVARRO-CRUZ, A. R., VERA-LÓPEZ, O., DÁVILA-MÁRQUEZ, R. M., MELGOZA-PALMA, N., & MEZA-PLUMA, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): Una Revisión de sus Usos no Culinarios. *Cienc. Mar*, **15**, 23-36.
6. BAEK, J. Y., KIM, B. H., KIM, D.-W., LEE, W.-Y., KIM, C. E., KIM, H.-Y., PYO, J., PARK, E.-S., & KANG, K. S. (2023). Hair growth effect of DN106212 in C57BL/6 mouse and its network pharmacological mechanism of action. *Current Issues in Molecular Biology*, **45**(6), 5071–5083. <https://doi.org/10.3390/cimb45060322>
7. BALLENGER, L. (1999). “*Mus musculus*” (On-line), ADW-Animal Diversity Web. Accessed August 13, 2023 at https://animaldiversity.org/accounts/Mus_musculus/
8. BAQUERO SOTO, J. A. (2019). Estudio de Factibilidad para la Creación de una Empresa de Producción de Jabones y Sales Fitoterapeúticas en Medellín. Trabajo de Grado de Maestría. Universidad EAFIT. Medellín. Colombia.
9. BARIKBIN, B., AYATOLLAHI, A., AHMADI, A. H. R., HEYDARZADEH, S. & ABDOLMALEKI, P. (2014). The Effect of Formulation Containing *Rosmarinus officinalis* on Hair Regrowth Compared to Minoxidil 5% Application. Resumen Presentado en el “3rd National Congress of Medicinal Plants”, May 2014. Mashhad. Iran.
10. BARVE, K. & DIGHE, A. (Eds.) (2016). **The Chemistry and Applications of Sustainable Natural Hair Products**. Springer International Publishing AG. Switzerland.
11. BAUTISTA, J. E., COVARRUBIAS, J. C. R. & GARCÍA, J. A. A. (2014). Evaluación de la Eficacia y Seguridad del Tratamiento Tópico y del Tratamiento Oral en la Alopecia Androgenética y Hormonal. *Anal. Méd. Asoc. Méd. Centr. Méd. ABC*, **59**, 8-15.
12. BEGUM, S., LEE, M. R., GU, L. J., HOSSAIN, J. & SUNG, C. K. (2015). Exogenous Stimulation with *Eclipta alba* Promotes Hair Matrix Keratinocyte Proliferation and Down

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

- Regulates TGF- β 1 Expression in Nude Mice. *Intern. J. Mol. Med.*, **35**, 496-502.
13. BENAVIDES, F. J., & GUÉNET, J. L. (2003). Las Líneas Genéticamente Estandarizadas y los Controles de la Pureza Genética, pág . 105-136. En, **Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios Básicos y Aplicaciones**, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares. Madrid. España y Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL). Madrid. España.
 14. BERDONCES, J. L. (2003). Historia de la Fitoterapia. *Natura Medicatrix: Rev. Méd. Estud. Difus. Med. Altern.*, **21**, 142-152.
 15. BORRÁZ-LEÓN, J. I., HERRERA-PÉREZ, J. J., CERDA-MOLINA, A. L. & MARTÍNEZ-MOTA, L. A. (2015). Testosterona y Salud Mental: Una Revisión. *Psiquiatr. Biol.*, **22**, 44-49.
 16. BRYDA, E. C. (2013). The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. *Missour. Med.*, **110**, 207–211.
 17. BUFFOLI, B., RINALDI, F., LABANCA, M., SORBELLINI, E., TRINK, A., GUANZIROLI, E., REZZANI R. & RODELLA, F. (2014). The Human Hair: From Anatomy to Physiology. *Intern. J. Dermatol.*, **53**, 331-341.
 18. CANO, E., ORTIZ, A. C., MARTÍNEZ LOMBARDO, M. C. & COBOS, J. A. (2009). Flora Medicinal Utilizada en las Enfermedades de la Piel y en Belleza. *Bol. Inst. Estud. Gienn.*, **200**, 165-179.
 19. CARO, R. A., CARRERA, J. P., CABELLO, M. M., GUERRERO, B. V., OVELAR, C., ENNME, I., & JIMÉNEZ, M. D. (2020). Uso de Plantas Medicinales en la Provincia de Sevilla. *RESCIFAR: Rev. Españ. Cien. Farm.*, **1**, 138-147.
 20. CEPEDA, L. D. L., GONZÁLEZ, M. G. & GARCÍA, E. C. L. (2014). Alopecia Cicatrizal como Manifestación de Lupus Eritematoso Cutáneo. *Rev. Centr. Dermatol. Pascua*, **23**, 22-28.
 21. CHEBIB, J., JACKSON, B. C., LÓPEZ-CORTEGANO, E., TAUTZ, D. & KEIGHTLEY, P. D. (2021). Inbred Lab Mice are not Isogenic: Genetic Variation within Inbred Strains Used to Infer the Mutation Rate per Nucleotide Site. *Heredity*, **126**, 107-116.
 22. Dagnino, J. (2014). Análisis de varianza. *Revista chilena de anestesia*, **43**(4), 306-310.
 23. DATTA, K., SINGH, A. T., MUKHERJEE, A., BHAT, B., RAMESH, B. & BURMAN, A. C. (2009). *Eclipta alba* Extract with Potential for Hair Growth Promoting Activity. *J. Ethnopharmacol.*, **124**, 450-456.
 24. DE MACEDO, L. M., SANTOS, É. M. D., MILITÃO, L., TUNDISI, L. L., ATAIDE, J. A., SOUTO, E. B. & MAZZOLA, P. G. (2020). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., Syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its Topical Applications: A Review. *Plants*, **9**, 651.
 25. DE OSORIO, A. M. (2014). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3RS de Russel. *Revista Colombiana de Bioética*, **1**(1), 163-184.
 26. DEBENEDICTIS, E. P. & KETEN, S. (2019). Mechanical Unfolding of Alpha-and Beta-Helical Protein Motifs. *Soft Matter*, **15**, 1243-1252.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

27. DEEDRICK, D. W., & KOCH, S. L. (2004). Microscopy of Hair Part 1: A Practical Guide and Manual for Human Hairs. *Forens. Sci. Commun.*, **6**, N° 1.
28. DUVERGER, O., & MORASSO, M. I. (2014). To Grow or Not to Grow: Hair Morphogenesis and Human Genetic Hair Disorders. *Semin. Cell Develop. Biol.*, **25**, 22-33.
29. EINBOND L. S., WU H. A., KASHIWAZAKI R., HE K., ROLLER M., SU T., WANG X. & GLODSBERRY S. (2012). Carnosic Acid Inhibits the Growth of ER-Negative Human Breast Cancer Cells and Synergizes with Curcumin. *Fitoterapia*, **83**, 1160-1168.
30. FERRANDO BARBERÁ, J. & LACUEVA MODREGO, L. (2000). Alopecias: Orientación Diagnóstica, Clínica y Terapéutica. *Med. Integr.*, **35**, 54-71
31. FIGUEROA, G. A., PÉREZ, B. I. M., NIETO, A. P., & RODRÍGUEZ, L. V. (2013). Elaboración de un Champú Empleando el Extracto Hidrosoluble de la Grana Cochinilla. Artículo “*in extensum*” pág. 284-290. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Agropecuaria, SOMECTA. Agosto 2013. Celaya. Guanajuato. México.
32. FIUME, M. M., (2013). Safety Assessment of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *Cosm. Ingred. Rev.*, August 16, 2013.
33. FIUME, M. M., BERGFELD, W. F., BELSITO, D. V., HILL, R. A., KLAASSEN, C. D., LIEBLER, D. C., MARKS, J. G. (Jr), SHANK, R. C., SLAGA, T. J., SNYDER, P. W., GILL, L. J. & HELDRETH, B (2018). Safety Assessment of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *Int. J. Toxicol.*, **37**, 12S-50S.
34. FOGH, J. & GIOVANELLA B. C. (Eds.). (1978). **The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research**. Academic Press Inc. New York. USA.
35. FUENTES LANDEO, V. R. & MONTES SEVILLANO, D. I. (2021). Actividad Antimicrobiana y Efecto Desinfectante del Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis* (Romero) en Vegetales de Consumo Directo. Trabajo de Grado. Universidad Roosevelt. Huancayo-Perú.
36. GIL-REDONDO, R., MORENO-ARRONES, O. M., VAÑÓ-GALVÁN, S. & JAÉN-OLASOLO, P. (2019). Alopecia. *Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, **12**, 5394-5404.
37. GONZÁLEZ, F. J., BRAVO, L., & AYALA, A. (2020). *Rosmarinus officinalis* L.(Rosemary): An ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics*, **7**(4), 77.
38. GRANADOS, P. M. M. (2017). Histofisiología del Folículo Piloso y su Importancia para la Medicina Regenerativa. *Morfología*, **9**, 46-54.
39. HAMISHEHKAR, H., GHANBARZADEH, S., SEPEHRAN, S., JAVADZADEH, Y., ADIB, Z. M. & KOUHSOLTANI, M. (2016). Histological Assessment of Follicular Delivery of Flutamide by Solid Lipid Nanoparticles: Potential Tool for the Treatment of Androgenic Alopecia. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **42**, 846-53.
40. HERMAN, A. & HERMAN, A. P. (2017). Topically used Herbal Products for the Treatment of

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

Hair Loss: Preclinical and Clinical Studies. *Arch. Dermatol. Res.*, **309**, 595-610.

41. HERRERA MATOS, S. B. (2017). Efecto Protector del Champú Conteniendo Extracto Etanólico de Corteza y Brotes Tiernos de *Colletia spinosissima* J. Gmelin (TACSANA) sobre la Irritación Inducida en Piel de Ratas.
42. HIRSHBURG, J. M., KELSEY, P. A., THERRIEN, C. A., GAVINO, A. C. & REICHENBERG, J. S. (2016). Adverse Effects and Safety of 5-Alpha Reductase Inhibitors (Finasteride, Dutasteride): A Systematic Review. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, **9**, 56-62
43. JUÁREZ-RENDÓN, K. J., RIVERA SÁNCHEZ, G., REYES-LÓPEZ, M. Á., GARCÍA-ORTIZ, J. E., BOCANEGRA-GARCÍA, V., GUARDIOLA-AVILA, I. & ALTAMIRANO-GARCÍA, M. L. (2017). Alopecia Areata: Actualidad y Perspectivas. *Arch. Argent. Pediatr.*, **115**, e404-e411.
44. KADRI, A, ZARAI, Z, BEN CHOBBA, I, BEKIR, A, GHARSALLAH, N., DAMAK, M. & GDOURA, R. (2011). Chemical Constituents and Antioxidant Properties of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Cultivated from South-Western Tunisia. *J. Med. Plant. Res.*, **5**, 5999-6004.
45. KIM, T. K. (2017). Understanding one-way ANOVA using conceptual figures. *Korean Journal of Anesthesiology*, **70**(1), 22. <https://doi.org/10.4097/kjae.2017.70.1.22>
46. LALONE, C. A., VILLENEUVE, D. L., CAVALLIN, J. E., NORBERG-KING, T. J., JOHNSON, R. D. & ANKLEY, G. T. (2013). Cross-Species Sensitivity to a Novel Androgen Receptor Agonist of Potential Environmental Concern, Spironolactone. *Environm. Toxic. Chem.*, **32**, 2528-2541.
47. LANDER, E. S., WATERSTON, R. H., SULSTON, J. & COLLINS, F. S. (2001). Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature*, **409**, 860-921.
48. LEE, Y., KIM, S. N., HONG, Y. D., PARK, B. C. & NA, Y. (2017). *Panax ginseng* Extract Antagonizes the Effect of DKK-1-Induced Catagen-Like Changes of Hair Follicles. *Intern. J. Mol. Med.*, **40**, 1194-1200.
49. LINARES, V. S. & ROSALES, L. N. (2019). Plasma Rico en Plaquetas Contra la Alopecia Androgénica. *Gacet. Méd. Espirit.*, **21**, 1-7.
50. LIU, X., JI, T., HU, H., LV, X. & ZHU, G. (2022). The Hair Growth-Promoting Effect of *Gardenia florida* Fruit Extract and its Molecular Regulation. *Evid.-Bas. Complem. Altern. Medic. (eCAM)*, **2022**, Article ID 8498974.
51. LOO SALINAS, A. & MOLINA VALIENTE, F. T. (2021). Estudio de Prefactibilidad para la Instalación de una Planta Procesadora de Shampoo a Base de Saponina de Quinoa como Tensoactivo Natural. Trabajo de Grado. Universidad de Lima. Lima. Perú.
52. LUND, M. (2015). Commensal Rodents. En BUCKLE A. P. & SMITH R. H. (Eds). **Rodent Pests and their Control (2nd Ed)**, pág. 19-32. CAB International. Wallingford. UK.
53. MALLARI, R. & SINCLAIR, R. D. (2002). Shortness of Breath: An Uncommon Side Effect of Cyproterone Acetate in the Treatment of Androgenetic Alopecia. *Int. J. Dermatol.*, **41**, 946-947.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

54. MARDONES, F. (2014). Productos Capilares Alternativos para Alopecia: Mecanismos de Acción y Evidencia Científica. *Rev. Chil. Dermat.*, **30**, 51-58.
55. MARTÍNEZ MARTÍNEZ, A. (2020). **Química de Productos Naturales**. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.
56. MASOUD, F., ALAMDARI, H. A., ASNAASHARI, S., SHOKRI, J. & JAVADZADEH, Y. (2020). Efficacy and Safety of a Novel Herbal Solution for the Treatment of Androgenetic Alopecia and Comparison with 5% Minoxidil: A Double-Blind, Randomized Controlled Trial Study. *Dermatol. Therap.*, **33**, e14467.
57. MAURTUA ROCA, L. V. & ZUÑIGA TRUCIOS, N. (2018). Efecto Estimulante del Crecimiento de Pelo de la Loción Capilar a Base de Extracto Alcohólico de las Hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero), *Urtica urens* L. (Ortiga) y *Equisetum arvense* (Cola de Caballo) en Conejos. Trabajo de Grado. Universidad Inca Garcilaso de la Vega (UIGV). Lima. Perú.
58. MIRANDA, A. Y. M., POIRETH, D. A. C., MÁRQUEZ, A. L. L. & FRANCO, R. T. (2019). Microinyecciones de Dutasterida para Alopecia Androgénica. *Dermatol. Cosmet. Méd. Quirurg.*, **17**, 89-93.
59. MORALES, J. P. Z., PIZARRO, W. J. Z., MACÍAS, V. I. V. & MORENO, E. A. (2017). Los Aminoácidos en el Cuerpo Humano. *RECIMUNDO: Rev. Cient. Invest. Conocim.*, **1**, 379-391.
60. Mori, O., & Uno, H. (1990). The effect of topical minoxidil on hair follicular cycles of rats. *The Journal of dermatology*, **17**(5), 276–281.
61. MURATA, K., NOGUCHI, K., KONDO, M., ONISHI, M., WATANABE, N., OKAMURA, K. & MATSUDA, H. (2013). Promotion of Hair Growth by *Rosmarinus officinalis* Leaf Extract. *Phytother. Res.*, **27**, 212-217.
62. NAGY, A., GERTSENSTEIN, M., VINTERSTEN, K. & BEHRINGER, R. (2003). Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual.(3rd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
63. NESTOR, M. S., ABLON, G., GADE, A., HAN, H. & FISCHER, D. L. (2021). Treatment Options for Androgenetic Alopecia: Efficacy, Side Effects, Compliance, Financial Considerations, and Ethics. *J. Cosmet. Dermatol.*, **20**, 3759-3781.
64. NÚÑEZ, C. E. (2008). Extracciones con Equipo Soxhlet. Recuperado de la siguiente página Web <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequipo Soxhlet.pdf>
65. NÚÑEZ-COLÍN, C. A. (2018). Análisis de varianza no paramétrica: un punto de vista a favor para utilizarla. *Acta agrícola y pecuaria*, **4**(3), 69–80. <https://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/55>
66. OH, J. Y., PARK, M. A. & KIM, Y. C. (2014). Peppermint Oil Promotes Hair Growth without Toxic Signs. *Toxicol. Res.*, **30**, 297-304.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

67. OMS. Organización Mundial de la Salud (OMS), (2014). Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014-2023. Geneve, Suiza.
68. ORĂSAN, M. S., & CONEAC, A. (2018). Evaluation of animal models suitable for hair research and regeneration. In I. Bartholomew (Ed.), *Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy*. InTech.
69. PALACIO, C.A., BETANCOURTH, P., ESTRADA-CELY, G.E., LÓPEZ-RUIZ, A.L., BALAGUERA, D.F., VESGA, J.A., BURGOS, A.L., SIMBAQUEVA, J.A., RODRÍGUEZ, J.S., CÓRDOBA, J.D., CAJIAO, M.N., GÓNGORA-MEDINA, M.E., RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A. & CORTÉS-VECINO, J.A. (2021). Bioética, bienestar y la experimentación con animales. **Asociación de Facultades de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Colombia – ASFAMEVEZ**. Bogotá, Colombia.
70. PARK, P. J., MOON, B. S., LEE, S. H., KIM, S. N., KIM, A. R., KIM, H. J., KIM, J. C., PARK, W. S., CHOI, K. Y., CHO, E. G. & LEE, T. R. (2012). Hair Growth-Promoting Effect of *Aconiti ciliare* Tuber Extract Mediated by the Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling. *Life Sci.*, **91**, 935-943.
71. PARK, S., SHIN, W. S. & HO, J. (2011). Fructus *Panax ginseng* Extract Promotes Hair Regeneration in C57BL/6 Mice. *J. Ethnopharmacol.*, **138**, 340-344.
72. PARK, Y. O., KIM, S. E. & KIM, Y. C. (2013). Action Mechanism of *Chamaecyparis obtusa* Oil on Hair Growth. *Toxicol. Res.*, **29**, 241-247.
73. PATEL, S., NAG, M. K., SHARMA, V., CHAUHAN, N. S., & DIXIT, V. K. (2014). A Comparative In Vivo and In Vitro Evaluation of Hair Growth Potential of Extracts and an Isolate from Petroleum Ether Extract of *Cuscuta reflexa* Roxb. *Beni-Suef Univ. J. Bas. Appl. Sci.*, **3**, 165-171.
74. PAULIN, J. V., FORNACIARI, B., BREGADIOLLI, B. A., BAPTISTA, M. S., & GRAEFF, C. F. (2021). Melanina, um pigmento natural multifuncional. *arXiv preprint arXiv:2107.12481*.
75. POLITI, M., FERRANTE, C., MENGHINI, L., ANGELINI, P., FLORES, G. A., MUSCATELLO, B. BRACA, A., & DE LEO, M. (2022). Hydrosols from *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, and *Cupressus sempervirens*: Phytochemical Analysis and Bioactivity Evaluation. *Plants*, **11**, 349.
76. PORTER, R. M. (2003). Mouse models for human hair loss disorders. *Journal of Anatomy*, **202**(1), 125-131.
77. QUEZADA, M. D. P. R., GAMARRA, O. & AZAHUANACHE, F. R. P. (2021). Tamizaje Fitoquímico y Actividad Antibacteriana de los Extractos de Seis Plantas Medicinales Usadas en Amazonas. *Med. Natur.*, **15**, 32-37.
78. RAJPUT, M. & KUMAR, N. (2020). Medicinal Plants: A Potential Source of Novel Bioactive Compounds Showing Antimicrobial Efficacy against Pathogens Infecting Hair and Scalp. *Gene Rep.*, **21**, 100879.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

79. RAŠKOVIĆ A., MILANOVIĆ I., PAVLOVIĆ N., ČEBOVIĆ T., VUKMIROVIĆ, S. & MIKOV, M. (2014). Antioxidant Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil and its Hepatoprotective Potential. *BMC Complement. Altern. Med.*, **14**, 225.
80. RESTREPO, R. (2010). Anatomía Microscópica del Folículo Piloso. *Rev. Asoc. Colomb. Dermatol. Cirug. Dermatol.*, **18**, 123-138.
81. REYES, J. Á. S., FERNÁNDEZ, L. M. G., ÁVILA, J. R. & BOUHANNA, P. (2007). El Pelo. Generalidades y Funciones. *Dermatol. Cosmet. Méd. Quirurg.*, **5**, 218-223.
82. RINGUELET, J. A. & VIÑA, S. Z. (2013). **Productos Naturales Vegetales**. EDULP-Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.
83. RODRÍGUEZ CAMPOS, R. D. P. (2017). Alopecia Androgénica de Inicio Precoz como Factor Asociado a Síndrome Metabólico. Trabajo de Grado. Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO). Trujillo. Perú. Recuperable [en https://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/2626](https://repositorio.upao.edu.pe/handle/20.500.12759/2626).
84. ROH, S. S., KIM, C. D., LEE, M. H., HWANG, S. L., RANG, M. J. & YOON, Y. K. (2002). The Hair Growth Promoting Effect of *Sophora flavescens* Extract and its Molecular Regulation. *J. Dermatol. Sci.*, **30**, 43-49.
85. SALAGER, J. (1988). Detergencia Fenómenos y Mecanismos. *Cuad. FIRP S331-A*, **1**, 1-15.
86. SAMANIEGO, J. & FUERTES RUITÓN, C. (2017). Diseño y Formulación de un Champú a Base de Extracto Alcohólico de *Urtica urens* L. para su Aplicación contra la Caída del Cabello. *Rev. Soc. Quím. Perú*, **83**, 265-272.
87. SAMPAYO MARTÍNEZ, L. (2015). Extracción por Agotamiento de los Productos Naturales del Hongo Huitlacoche (*Ustilago maydis*). Trabajo de Grado. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. México.
88. SARKER, S. D., LATIF, Z. & GRAY, A. I. (2006). Natural Product Isolation, An Overview. En, SARKER, S. D., LATIF, Z. & GRAY, A. I. (Eds) **Methods in Biotechnology, Vol. 20, Natural Products Isolation, 2nd Ed.** Humana Press Inc. Totowa. New Jersey. USA.
89. SCHEINBERG, M., DE LUCENA COUTO OCEA, R. A., CRUZ, B. A. & FERREIRA, S. B. (2017). Brazilian Experience of the Treatment of Alopecia Universalis with the Novel Antirheumatic Therapy Tofacitinib: A Case Series. *Rheumatol. Ther.*, **4**, 503-508.
90. SCHLAKE, T. (2007). Determination of Hair Structure and Shape. *Semin. Cell Develop. Biol.*, **18**, 267-273.
91. SERRANO, J. (2020). Curso: Instrumentación y Métodos de Análisis Químico. Espectroscopía Infrarroja I. Posgrado en Ingeniería del agua y del terreno. Documento Recuperado de https://www.upct.es/~minaees/espectroscopia_infrarroja.pdf
92. SHEN, Y. L., LI, X. Q., PAN, R. R., YUE, W., ZHANG, L. J. & ZHANG, H. (2018). Medicinal Plants for the Treatment of Hair Loss and the Suggested Mechanisms. *Curr. Pharm. Design*, **24**, 3090-3100.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

93. SILVA, L. S. S. & SANTOS, J. S. (2021). Aplicabilidad de Dos Óleos Vegetais em Tônicos Capilar: Uma revisão. *Res. Soc. Develop.*, **10**, e124101522725.
94. SIMON, M. M., GREENAWAY, S., WHITE, J. K., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., WELLS, S., HERAULT, Y. & BROWN, S. D. (2013). A Comparative Phenotypic and Genomic Analysis of C57BL/6J and C57BL/6N Mouse Strains. *Gen. Biol.*, **14**, 1-22.
95. SORIA, N. (2018). Las Plantas Medicinales y su Aplicación en la Salud Pública. *Rev. Sal. Públ. Parag.*, **8**, 7-8.
96. SOVAK, M., SELIGSON, A. L., KUCEROVA, R., BIENOVA, M., HAJDUCH, M. & BUCEK, M. (2002). Fluridil, a Rationally Designed Topical Agent for Androgenetic Alopecia: First Clinical Experience. *Dermatol. Surg.*, **28**, 678-685.
97. SUÁREZ GONZAGA, O. A. (2017). Obtención de Queratina a Partir de Cabello Humano para la Formulación de un Producto Cosmético. Trabajo de Grado. Universidad Central del Ecuador (UCE). Quito. Ecuador.
98. Suchonwanit, P., Thammarucha, S., & Leerunyakul, K. (2019). Minoxidil and its use in hair disorders: a review. *Drug design, development and therapy*, **13**, 2777–2786.
99. SUGAR, A. M., ALSIP, S. G., GALGIANI, J. N., GRAYBILL, J. R., DISMUKES, W. E., CLOUD, G. A., CRAVEN, P. C. & STEVENS, D. A. (1987). Pharmacology and Toxicity of High-Dose Ketoconazole. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, **31**, 1874-1878.
100. TAKADA, K., NAKAMURA, A., MATSUO, N., INOUE, A., SOMEYA, K. & SHIMOGAKI, H. (2003). Influence of Oxidative and/or Reductive Treatment on Human Hair (I): Analysis of Hair-Damage after Oxidative and/or Reductive Treatment. *J. Oleo Sci.*, **52**, 541-548.
101. TAKADA, K., SOMEYA, K., MATSUO, N., NISHIDA, Y. & HAYASHI, T. (2003). Influence of Oxidative and/or Reductive Treatment on Human Hair (II): Effect of Hydrophilic Extracts from *Rosmarinus officinalis* L. on Oxidative and/or Reductive Hair-Damage. *J. Oleo Sci.*, **52**, 549-556.
102. TAPIA, C. E. F., & CEVALLOS, K. L. F. (2021). Pruebas para comprobar la normalidad de datos en procesos productivos:: Anderson-Darling, Ryan-Joiner, Shapiro-Wilk Y Kolmogórov-Smirnov. *Societas*, **23**(2), 83-106.
103. TEIXEIRA, B., MARQUES, A., RAMOS, C., NENG, N. R., NOGUEIRA, J. M. F., SARAIVA, J. A. & NUNES, M. L. (2013). Chemical Composition and Antibacterial and Antioxidant Properties of Commercial Essential Oils. *Ind. Crop Prod.*, **43**, 587-595.
104. TIGIST, G., MEKONNEN, M., MENGESHA, B. & PHILIPHOS, M. (2016). **Rosemary Production and Utilization**. Ethiopian Institute of Agricultural Research (EIAR). Addis Abeba. Etiopía
105. VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., SMITH, H. O., YANDELL, M., XIA, A., ZANDIEH, A. & ZHU, X. (2001). The

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

Sequence of the Human Genome. *Science*, **291**, 1304-1351.

106. WADE, L. G. (2012). **Química Orgánica, Vol 1 & 2 (8th Ed)**. Pearson Educación. México.
107. WANG, B., YANG, W., MCKITTRICK, J. & MEYERS, M. A. (2016). Keratin: Structure, Mechanical Properties, Occurrence in Biological Organisms, and Efforts at Bioinspiration. *Progr. Mater. Sci.*, **76**, 229-318.
108. WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J. F., AGARWAL, P., YANG, S.-P., ZDOBNOV, E. M., ZODY, M. C. & LANDER, E. S. (2002). Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome. *Nature*, **420**, 520-562.
109. WILKINSON, R. J. & MOORE, J. B. (1990). **Cosmetología de Harry**. (2^a Ed). Ediciones Díaz de Santos, S. A. Madrid. España.
110. XIAO, L., ZHANG, X., CHEN, Z., LI, J., LI, B., & LI, L. (2020). Molecular pathways involved in promoting activity of timosaponin BII on hair growth in C57BL/6 mice. *BioMed Research International*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/9451596>
111. XIAO, Q., WANG, L., SUPEKAR, S., SHEN, T., LIU, H., YE, F., Huang, J., Fan, H., Wei, Z. & ZHANG, C. (2020). Structure of Human Steroid 5 α -Reductase 2 with the Anti-Androgen Drug Finasteride. *Nature Comm.*, **11**, 5430
112. YANG, F. C., ZHANG, Y. & RHEINSTÄDTER, M. C. (2014). The Structure of People's Hair. *Peer J*, **2**, e619.
113. YOON, J. I., AL-REZA, S. M. & KANG, S. C. (2010). Hair Growth Promoting Effect of *Zizyphus jujuba* Essential Oil. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1350-1354.
114. ZGONC ŠKULJ, A., POLJŠAK, N., KOČEVAR GLAVAČ, N. & KREFT, S. (2020). Herbal Preparations for the Treatment of Hair Loss. *Arch. Dermatol. Res.*, **312**, 395-406.
115. ZHANG, X., & HARTMANN, P. (2023). How to calculate sample size in animal and human studies. *Frontiers in Medicine*, **10**, 1215927. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1215927>.
116. ZHANG, Y., NI, C., HUANG, Y., TANG, Y., YANG, K., SHI, X., ZHANG, Y., LI, Z., WANG, J., ZHU, Y., LI, H., MA, Y., LIN, J., WANG, J., LIU, Q., & WU, W. (2021). Hair growth-promoting effect of resveratrol in mice, human hair follicles and dermal papilla cells. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, **14**, 1805–1814. <https://doi.org/10.2147/ccid.s335963>

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6/BIOU

Anexos

Anexo 1. Aval de CEBIOULA.



Mérida, 21 de febrero 2024

Protocolo; CEBIOULA/131

Estudiante Robert José Aljorna Molero

El comité de ética del BIOULA, evaluó el proyecto "Estudio de la Capacidad de Crecimiento Capilar de Productos Elaborados con Extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis*) en Ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU", identificado por el comité como protocolo CEBIOULA/131.

Cuyo objetivo es estudiar, de manera experimental, la capacidad promotora del crecimiento capilar de distintos productos derivados de romero (*Rosmarinus officinalis*) de forma individual (en forma de extracto, hidrolato y aceite esencial) y en conjunto (en forma de tónico capilar y champú) en ratones (*Mus musculus*) de la línea C57BL6//BIOU.

Luego del análisis correspondiente de este proyectó, el comité decidió **OTORGAR el AVAL BIOETICO** para la realización del trabajo, debido a los siguientes elementos de juicio

- 1.- El diseño metodológico es adecuado.
- 2.- El protocolo cumple con las normas bioéticas en el uso de animales experimentales y las personas involucrados en el mismo serán asesoradas y apoyadas técnicamente por el personal de Bioética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), el cual posee amplia experiencia en la materia.

Atentamente,

Por el Comité de Ética


Prof(a). Belkis Quiñónez


M.V. Yépsys Montero


Prof(a). Katusca Villasana

La Hechicera, vía principal de Santa Rosa, Edificio BIOULA

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

Anexo 2. Imágenes del Ensayo en ratones



Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

101

Glosario

- **Adherencia (en medicina):** número total de días de toma de medicación de acuerdo con las pautas del prescriptor durante el periodo de seguimiento.
 - **Anestesia:** pérdida temporal de las sensaciones de tacto y dolor producida por un medicamento.
 - **Bioterio:** lugar acondicionado para criar, mantener y utilizar animales de laboratorio o experimentación
 - **Ciclo estral:** conjunto de fenómenos que ocurren entre dos menstruaciones. Es un conjunto de acontecimientos fisiológicos recurrentes que son inducidos por las hormonas reproductivas.
 - **Consanguíneo:** que tiene parentescos de consanguineidad con uno o varios individuos.
 - **Cualitativo:** relativo a cualidad.
 - **Cuantitativo:** relativo a cantidad.
 - **Desviación estándar:** es una medida de la dispersión de los datos. Es decir, mide cuánto se alejan los valores de los datos de la media. Cuanto mayor sea la dispersión, mayor es la desviación estándar.
 - **Dorsal:** perteneciente o relativo al dorso, espalda o lomo.
 - **Emoliente:** sustancia que se emplea para ablandar o suavizar un tejido.
 - **Estadístico W:** es un estadístico de prueba que se utiliza en la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si un conjunto de datos proviene de una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk es aplicable cuando se analizan muestras compuestas por menos de 50 elementos.
- $$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$
- **Eutanasia:** fallecimiento sin dolor físico.
 - **Folículo piloso:** cavidad en forma de saco o bolsa formada por un grupo de células. En los ovarios, un folículo contiene un óvulo, y en la piel, un folículo contiene un cabello.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

- **Glándula sebácea:** órgano que produce una secreción que puede verterse a través de la piel o de las mucosas, como las glándulas salivales y sudoríparas, o al torrente sanguíneo, como el tiroides.
- **Hipoactividad sexual:** conducta caracterizada por un déficit de actividad sexual.
- **Histología:** disciplina científica que se ocupa del estudio de las estructuras microscópicas de los seres vivos.
- **Hormona:** producto de secreción de ciertas glándulas que, transportado por el sistema circulatorio, excita, inhibe o regula la actividad de otros órganos o sistemas de órganos.
- **Humectante:** sustancia que mantiene el agua contenido dentro de un material.
- **In vitro:** locución latina que significa "en el vidrio". Se utiliza para referirse a algo que sucede en un tubo de ensayo, en un medio de cultivo o en otro ambiente artificial de laboratorio.
- **Inflamación:** alteración patológica en una parte cualquiera del organismo, caracterizada por trastornos de la circulación de la sangre y, frecuentemente, por aumento de calor, enrojecimiento, hinchazón y dolor.
- **Libido:** impulso y raíz de las más variadas manifestaciones de la actividad psíquica. lujuria, lubricidad, lascivia, concupiscencia, deseo, apetito, libidine.
- **Múrido:** adjetivo que se refiere a un mamífero del orden de los roedores.
- **p-Valor (en estadística):** es una medición estadística entre 0 y 1 que se usa para el contraste de hipótesis. En estadística general y contrastes de hipótesis, el valor p se define como la probabilidad de que un valor estadístico calculado sea posible dada una hipótesis nula cierta.

$$Z_{p\text{-valor}} = \frac{\bar{X} - \mu_0}{\sigma/\sqrt{n}}$$

- **Raza:** cada uno de los grupos en que se subdividen algunas especies biológicas y cuyos caracteres diferenciales se perpetúan por herencia
- **Roedor:** mamífero, generalmente pequeño, unguiculado, con dos incisivos en cada mandíbula, largos, fuertes y encorvados hacia fuera, cuyo crecimiento es continuo y que le sirven para roer.

Estudio de la capacidad de crecimiento capilar de productos elaborados con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en ratones (*Mus musculus*) C57BL6//BIOU

Robert Aljorna

- **Solvente:** sustancia que puede disolver y producir con otra una mezcla homogénea.
- **Taxonomía:** ciencia que estudia los principios, métodos y fines de la clasificación. En particular, se aplica en biología para ordenar de forma jerárquica y sistemática los grupos de animales y vegetales, con sus nombres.
- **Volátil:** capacidad de un compuesto para pasar de un estado líquido a un estado gaseoso. Esto permite que el compuesto se disperse en el aire.

www.bdigital.ula.ve