

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

ACTIVIDAD IRRITANTE OCULAR IN VITRO POR EL METODO DEL HET – CAM DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA RAIZ, TALLO Y HOJAS DE *Rumex crispus* L. “CUTURRUMASA”

Tesis para optar el Título Profesional de Químico

Farmacéutico y Bioquímico

TESISTA

BCH. MERCEDES DEL PILAR RIVERA HUAYTALLA

ASESOR

Dr. Q.F. PABLO ENRIQUE BONILLA RIVERA

FECHA DE SUSTENTACION:

15 de Diciembre del 2017

Lima - Perú

2017

**ACTIVIDAD IRRITANTE OCULAR IN VITRO POR EL
METODO DEL HET – CAM DEL EXTRACTO ETANOLICO DE
LA RAIZ, TALLO Y HOJAS DE *Rumex crispus L.*
“CUTURRUMASA”**

DEDICATORIA

A DIOS, por darme la oportunidad de vivir y estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido el soporte y compañía durante todo este tiempo de estudio.

A mis padres Adrián Rivera A. y Gladis Huaytalla R. por estar siempre a mi lado cuando más lo necesito, en los buenos y malos momentos de mi vida, por mostrarme en cada momento su apoyo incondicional y el interés para que estudie y me desarrolle completamente en todos los aspectos de mi vida, ya que son para mí la base fundamental de mi vida, pues ellos me han sabido guiar, levantarme y sostenerme. Muchas gracias por mostrarme que todo lo que me proponga lo puedo lograr que con esfuerzo y dedicación nada es imposible sin importar el tiempo y el espacio.

A mis hermanos Ricky y Fernando por ser parte de mi vida por ayudarme a crecer y madurar junto a ellos.

A mis tíos y mi abuelita Donata que siempre han formado una parte muy importante dentro de mi vida por brindarme su cariño, comprensión y el ejemplo de que todo es posible sin importar las condiciones.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor de tesis Q.F. Pablo Enrique Bonilla Rivera por su valioso apoyo, orientación y generosidad; por compartir sus amplios conocimientos y experiencia para desarrollar y culminar el presente trabajo.

Al Q.F. Neuman Mario Pineda Pérez por su gran apoyo, consejo y orientación que permitieron la realización del presente trabajo.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica Inca Garcilaso de la Vega y a cada uno de sus miembros, que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo

RESUMEN

La utilización de técnicas alternativas para determinar actividades terapéuticas cada día va tomando más interés por la comunidad científica, por lo tanto, demostrar la efectividad de estos métodos habrá una ventana a nuevas investigaciones. El presente estudio tuvo por objetivo determinar la actividad irritante, el extracto etanólico de Raíz, Tallo y Hojas de *Rumex crispus* L. "Cuturumasa". Mediante el método de HET CAM. Se identificó los metabolitos presentes en el extracto etanólico, obteniendo: Carbohidratos, Compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, aminoácidos y quinonas. Se prepararon 4 diluciones al 5%, 2%, 1% y 0.5% para las muestras de raíz, tallo y hojas, se trabajó con grupos control de Hidróxido de sodio al 0.1N, lauril sulfato de sodio al 1% y suero fisiológico; también se evaluó la actividad del solvente en las membranas corioalantoidea de huevos fértiles de gallina (*Gallus gallus domesticus*), con 9 días de incubación artificial. Se comprobó que la dilución al 0.5% del extracto etanólico de Hojas, de *Rumex Crispus* L. "Cuturumasa", No produce rompimiento de la membrana corioalantoidea demostrado por la determinación del índice de irritabilidad (I.I) menor a 0.9. La raíz y el tallo si producen índice de irritabilidad (I.I) mayor a 1.0 en todas sus concentraciones. Se concluyó que los índices de irritación obtenidos al 0.5% del extracto etanólico de Hojas, de *Rumex crispus* L. "Cuturumasa", es clasificada como no irritante y constituye un soporte de seguridad para continuar con pruebas de eficacia clínica.

Palabras clave: membrana corioalantoidea, actividad irritante, extracto etanólico

ABSTRACT

The use of alternative techniques to determine therapeutic activities every day is taking more interest in the scientific community, therefore, to demonstrate the effectiveness of these methods there will be a window to further research. The objective of this study was to determine the irritant activity, the ethanolic extract of Root, Stem and Leaves of *Rumex crispus* L. "Cuturumasa". Through the HET CAM method. The metabolites present in the ethanolic extract were identified, obtaining: Carbohydrates, phenolic compounds, tannins, flavonoids, amino acids and quinones. Four dilutions were prepared at 5%, 2%, 1% and 0.5% for the samples of root, stem and leaves, we worked with control groups of 0.1N sodium hydroxide, 1% sodium lauryl sulfate and physiological saline; The activity of the solvent in the chorioallantoic membranes of chicken fertile eggs (*Gallus gallus domesticus*) was also evaluated, with 9 days of artificial incubation. It was verified that the 0.5% dilution of the ethanolic leaf extract, from *Rumex Crispus* L. "Cuturumasa", does not produce a rupture of the chorioallantoic membrane demonstrated by the determination of the irritability index (I.I) less than 0.9. Root and stem if they produce index of irritability (I.I) greater than 1.0 in all its concentrations. It was concluded that the irritation rates obtained at 0.5% of the ethanolic extract of Leaves, of *Rumex crispus* L. "Cuturumasa", is classified as non-irritating and constitutes a safety support to continue with clinical efficacy tests.

Keywords: chorioallantoic membrane, irritant activity, ethanolic extract

INDICE

Dedicatoria

Agradecimiento

Índice de tablas

Indice de figuras

Indice de anexos

Resumen

Abstract

	Página
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	3
1.2. Identificación y formulación del problema.....	5
1.2.1. Problema general.....	5
1.2.2. Problemas específicos.....	6
1.3. Objetivos de la investigación.....	6
1.3.1. Objetivo general.....	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
1.4. Justificación y viabilidad de la investigación.....	7
1.5. Limitación de la investigación.....	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Antecedentes de la investigación.....	9
2.1.1. Antecedentes Nacionales.....	9
2.1.1 Antecedentes Internaciona.	17
2.2. Bases Legales.....	20

2.2.1 Normas Nacionales	20
2.2.2 Normas Internacionales.....	21
2.3 Bases Teóricas.....	21
2.3.1. Bases teóricas de la variable “Extracto etanólico de raíz, tallo, hojas, de <i>Rumex crispus</i> L."Cuturrumasa”.....	21
2.3.1.1. Descripción general de la planta.....	22
2.3.1.2. Distribución botánica.....	22
2.3.1.3. Identificación taxonómica.....	23
2.3.1.4. Descripción física de la planta	23
2.3.1.5. Propiedades curativas.....	25
2.3.1.6. Metabolitos secundarios.....	25
2.3.1.7. Tipo de metabolitos secundarios básicos.....	26
2.3.1.8. Registro de campo	27
2.3.2. Bases teórica de la variable “Actividad irritante ocular in Vitro por el método Het – Cam.”.....	32
2.4. Formulación de hipótesis.....	35
2.4.1. Hipótesis general.....	35
2.4.2. Hipótesis específicas.....	35
2.5. Operacionalización de variables e indicadores.....	35
2.6. Definición de términos básicos.....	36
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	41
3.1. Tipo y nivel de investigación.....	41
3.2. Diseño de investigación	42
3.3. Población y muestra de la investigación.....	43
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	44
3.4.2. Validación de instrumentos.....	45
3.5. Técnica de procesamiento y análisis de datos	46
CAPÍTULO IV: PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS.....	47
4.1. Procesamiento de datos.....	47

4.2. Discusión y Resultados.....	71
CAPÍTULO V: CONCLUSION Y RECOMENDACIONES.....	73
5.1. Conclusiones.....	73
5.2. Recomendaciones.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	80

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Validación de los expertos	46
TABLA 2.	Prueba de solubilidad del Extracto etanólico de raíz de Rumex crispus L."Cuturumasa"	57
TABLA 3.	Prueba de solubilidad del Extracto etanólico de tallo de Rumex crispus L."Cuturumasa"	58
TABLA 4.	Fitocostituyentes presentes en el Extracto etanólico de hojas de Rumex crispus L."Cuturumasa"	58
TABLA 5.	Fitocostituyentes presentes en el extracto etanólico raíz Rumex crispus L."Cuturumasa"	59
TABLA 6.	Fitocostituyentes presentes en el extracto etanólico tallo Rumex crispus L."Cuturumasa"	60
TABLA 7.	Fitocostituyentes presentes en el extracto etanólico hojas Rumex crispus L."Cuturumasa"	61
TABLA 8.	Clasificación para determinar la irritabilidad según su rango	65
TABLA 9.	Resultados de los controles del método Het – Cam	67
TABLA 10.	Resultados del método Het – Cam del Extracto etanólico de la Raíz de Rumex Crispus L. "Cuturumasa".	68
TABLA 11.	Resultados del método Het – Cam del Extracto alcohólico del Tallo de Rumex Crispus L. "Cuturumasa".	69
TABLA 12.	Resultados del método Het – Cam del Extracto alcohólico de la hoja de Rumex Crispus L. "Cuturumasa".	70

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Rumex crispus L., Krauser Ampfer	21
FIGURA 2.	Rumex crispus medicines	24
FIGURA 3.	Huevo de gallina fertil(Gallus gallus domesticus)	34
FIGURA 4.	Flujograma preparación de muestra raíz, tallo, hojas, de <i>Rumex crispus L.</i> "Cuturumasa"	48
FIGURA 5.	Flujo grama preparación del extracto etanólico de raíz, tallo, hojas, de <i>Rumex crispus L.</i> "Cuturumasa"	50
FIGURA 6.	Flujo grama del estudio con el método in vitro basado en el Método Het –Cam	66
FIGURA 6.	<i>Rumex crispus L.</i> "Cuturumasa"	85
FIGURA 8.	Recolección de Raíz Tallo y Hojas frescas de la <i>Rumex crispus L.</i> "Cuturumasa"	86
FIGURA 9.	Raíz Tallo y Hojas desecadas del <i>Rumex crispus L.</i>	87
FIGURA 10.	Raíz Tallo y Hojas trituración del <i>Rumex crispus L.</i>	88
FIGURA 11.	Raíz Tallo y Hojas maceración de <i>Rumex crispus L.</i>	89
FIGURA 12.	Raíz Tallo y Hojas filtrado de <i>Rumex crispus L.</i>	90
FIGURA 13.	Raíz Tallo y Hojas extracto de <i>Rumex crispus L.</i>	91
FIGURA 14.	Prueba de solubilidad de las hojas de <i>Rumex crispus L.</i>	92
FIGURA 15.	Reacciones químicas del extracto etanolico de <i>Rumex crispus L.</i>	93

FIGURA 16. Laboratorio de Farmacia bioquímica de la facultada de UNMSM	94
FIGURA 17. Granja de Gallinas y Gallos en el galpón del Distrito de Chosica	95
FIGURA 18. Huevos fértiles para el Het - Cam	96
FIGURA 19. Elaboración de la incubadora	97
FIGURA 20. Incubadora artesanal para el HET CAM	98
FIGURA 21. Ovoscopio artesanal para el HET CAM	99
FIGURA 22. Preparación de las diluciones para el HET CAM	100
FIGURA 23. Homogenizando en Vortex las diluciones para el HET CAM	101
FIGURA 24. Señalizaciones de la cámara de aire para romper el huevo	102
FIGURA 25. Ruptura de la cascara de la cámara de aire del huevo	102
FIGURA 26. Eliminar con mucho cuidado la primera membrana blanquecina	103
FIGURA 27. Exposición de la MCA para el procedimiento de HET CAM	104
FIGURA 28. Procedimiento de HET CAM control con Hidróxido de sodio	105
FIGURA 29. Procedimiento de HET CAM control con Lauril sulfato de sodio	105
FIGURA 30 Procedimiento de HET CAM control con etanol (solvente)	106
FIGURA 31. Procedimiento de HET CAM control con suero fisiológico	107
FIGURA 32. Procedimiento de HET CAM del Extracto alcohólico de la Raíz de Rumex Crispus L.(Cuturumasa)	108
FIGURA 33. Procedimiento de HET CAM del Extracto alcohólico de la Tallo de Rumex Crispus L. (Cuturumasa)	109
FIGURA 34. Procedimiento de HET CAM del Extracto alcohólico de la Hoja de Rumex Crispus L. (Cuturumasa)	110

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Matriz de consistencia	76
ANEXO2. Matriz de consistencia	82
ANEXO 3. Operacionalidad de variables	77
ANEXO 4. Constancia botánica de la especie <i>Rumex crispus</i> L.	84

INTRODUCCION

El Perú tiene en su biodiversidad una fuente de agentes medicinales que pueden constituir el primordial recurso terapéutico del mundo en su búsqueda de la salud, el habitante del Perú ha profundizado en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales ampliando su experiencia en el empleo de sus metabolitos y legado una rica tradición a la cultura popular, pero que hasta aún carece de información científica respecto a su actividad farmacológica y toxicológica.

Los laboratorios evalúan la irritabilidad ocular in vivo según el método de Draize y esta requiere de la aplicación de las sustancias de ensayo en la conjuntiva del animal de experimentación (conejos), sometiéndolo en muchos casos al dolor, ulceración y hasta necrosis de las estructuras oculares.

Hoy la búsqueda de métodos alternativos in vitro para evitar el daño y exposición a animales es una gran urgencia por la comunidad científica y con el fin de calmar los reclamos de un sector de la población es que pruebas como Het- Cam debe tomarse más en cuenta.

En la presente investigación se usó la especie de *Rumex crispus* L. “cuturumasa” una especie nativa peruana del departamento de Junín provincia de Jauja la cual fue evaluada taxonómicamente en el herbario de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para determinar la actividad irritante ocular in vitro por el método Het - Cam se preparó un extracto etanólico con la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “cuturumasa” obteniendo como metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, flavonoides y quinonas. Para la prueba in vitro se consiguió huevos de gallina fértil (*Gallus gallus domesticus*). En el criadero del distrito de Chosica.

Para la incubación de los huevos se elaboró una incubadora artesanal programada para el control de temperatura y humedad que permitió el desarrollo de la membrana corioalantoidea.

Para evaluar la actividad irritante se preparó cuatro concentraciones con el extracto las cuales fueron aplicados en la membrana y se pudo cuantificar irritabilidad que han sido descritos en las tablas anexas.

El desarrollo de métodos alternativos cuanto más se realizan, forman parte de una herramienta del investigador por la comunidad científica termina por aprobar y así poder desarrollar pruebas sin sacrificio animales.

Las fuentes bibliográficas provenientes de años de investigación en especial de libros fitoquímicos y tesinas.

La estructura del trabajo está dividida en cinco capítulos, que describen el desarrollo del proyecto realizado.

En el Capítulo I se presenta planteamiento de la investigación, el problema se describen claramente los objetivos a conseguir, la justificación y limitaciones de la misma.

En el Capítulo II nos representa el marco teórico las bases legales y teóricas necesarias para la comprensión de la actividad irritante ocular in vitro del extracto etanólico de *Rumex crispus* L. mediante el método Het - Cam.

En el Capítulo III empieza el trabajo de diseño de la investigación donde se aborda los procedimientos a realizar para obtener el grado de actividad irritante ocular in vitro.

En el Capítulo IV se ofrece el análisis y discusión de los resultados.

Finalmente, en el Capítulo V se presenta las conclusiones y recomendaciones de la tesis.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática.

Los órganos de los sentidos, le proporciona al hombre el conocimiento del mundo físico que le rodea; el ojo ocupa un lugar predominante por su posibilidad de aprehender la energía visible y convertirla en neuroseñales que se trasladan a través del nervio óptico en dirección al cerebro en el que produce la visión.

El ojo está continuamente expuesto al ambiente, por la cual resulta frágil al ataque de algún agente físico o químico, que pudiera provocar perturbación, daño o pérdida de la visión en dependencia del nivel de severidad que ocasione. Por lo cual resulta importante considerar lo más rigurosamente factible el potencial irritante de algún principio activo que tenga contacto con el ojo y sus estructuras adyacentes. ⁽¹⁾

En los últimos años la ciencia ha hecho esfuerzos por encontrar modelos alternativos experimentales, para determinar efectos de irritación, el continuo maltrato a animales de experimentación, trajo por consiguiente el rechazo de un sector de la población por lo despiadado que podía ser esta práctica por lo tanto la importancia de contar con un modelo diferente de investigación se hizo necesaria. Esta técnica radica en que se podrá desarrollar una metodología donde el sujeto de estudio no sufra daño y los resultados podrán ser utilizados por varias áreas de las ciencias farmacéuticas. Algunas comunidades en nuestro país utilizan las semillas raíces, tallos, hojas de muchas plantas mediante la cocción en agua para combatir la inflamación de los ojos. ⁽²⁾

Para evaluar el riesgo ocular, requiere de una valoración toxicológica. Los exámenes toxicológicos, in vivo, se emplean comúnmente para la valoración de la inocuidad y fiabilidad de los componentes de productos farmacéuticos. Una prueba que permita valorar los eventos a este nivel y establecer irritación ocular que realizan las sustancias químicas, medicamentos y cosméticos descrito por Draize. A partir de su preámbulo esta prueba fue criticada intensamente por razones éticas y científicas. Lo cual incentivo la búsqueda de nuevas alternativas para eliminar las deficiencias encontradas basadas fundamentalmente en la reducción de animales a utilizar, la metodología y el reemplazo por métodos in vitro.⁽³⁾

Modelos in vitro incorporan el uso de biomarcadores, cultivo de células, órganos y tejidos, modelos farmacocinéticos, análisis de HPLC, también como la correlación estructura actividad, y sus puntos finales están basados en el examen de la morfología celular, la función fisiológica hística, la respuesta inflamatoria o inmunológica y la recuperación o restablecimiento de los tejidos.⁽⁴⁾

Las alternativas in vitro tienen ventajas potenciales sobre las pruebas in vivo debido a su sencillez, celeridad y cuantificación de puntos finales, asimismo condicionan una reducción en el número y la disminución de dolor y el estrés de diferentes animales. El test de irritación ocular Het - Cam es un método utilizado para evaluar la irritación potencial de productos cosméticos. Se realiza en huevos de gallina sobre la capa corioalantoidea, la cual contiene las arterias, venas y capilares. El nivel de irritación se determina a través del proceso inflamatorio sufrido, determinado el tiempo de aparición de los efectos observando sobre dicha membrana (hemorragia, lisis vascular y coagulación). La celeridad en la aparición y la magnitud de los daños son expresión del potencial irritante de la sustancia determinada.⁽⁵⁾

La implementación de ensayos in vitro y la actual demanda social y legislativa, promueven la implantación de las tres “erres” (RRR) de Rusell y Burch: reducción, refinamiento y reemplazo, lo cual la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, fomenta el desarrollo científico de métodos que contribuyan a reducir la utilización de animales de experimentación en las pruebas toxicológicas. Algunos laboratorios del mundo han incorporado el procedimiento de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (hen’s egg test chorioallantoic membrane, Het - Cam) para determinar la irritación ocular producida por cosméticos; por su sencillez, sensibilidad, fácil elaboración y su alusivo bajo costo. ⁽⁶⁾

1.2. Identificación y formulación del problema

1.2.1. Problema general.

1. ¿Presenta actividad irritante ocular in vitro por el método de Het – Cam el extracto etanólico de la raíz, tallo, hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturumasa”?

1.2.2. Problemas específicos.

1. ¿Cuál será la composición del extracto etanólico de la raíz y tallo, hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturumasa”?

2. ¿Tendrán actividad irritante los metabolitos de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturrumasa” mediante el método de Het – Cam?

1.3. Objetivos de la investigación.

1.3.1. Objetivo general.

Determinar la actividad irritante ocular in vitro por el método de Het – Cam y la composición química del extracto etanólico de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturrumasa”.

1.3.2. Objetivos específicos.

1. Obtener el extracto etanólico de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturrumasa” y determinar sus componentes fitoquímicos.
2. Determinar el efecto irritante de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturrumasa” mediante el método de Het – Cam.

1.4. Justificación y viabilidad de la investigación.

La ejecución de la presente investigación es de interés porque se necesita encontrar nuevas alternativas de procedimientos con seres vivos.

La investigación es importante porque poseen ventajas importantes sobre las pruebas in vivo por su sencillez, rapidez y a la cuantificación de los puntos finales, de tal manera influyen a una disminución en el número de animales y una reducción del dolor y el estrés de seres vivos (animales).

Es novedosa, porque se utiliza un procedimiento que es poco conocido pero muy efectivo en cuestión de determinar efecto toxicológico irritante.

Es factible y viable, puesto que se cuenta con las muestras y materiales de estudio y además la universidad cuenta con todos los reactivos y equipos para desarrollar este proyecto. Además, que el costo de investigación no es muy elevado lo cual permite terminar con éxito la parte experimental.

Los beneficiarios de esta investigación será la población de escasos recursos económicos de la ciudad de Lima y del interior del país.

Es actual, porque mediante a esta técnica podemos llegar a la solucionar con el empleo de plantas medicinales muchas enfermedades y utilizarlas en dolencias no solo en Lima sino también en cualquier lugar de nuestro país

Esta información constituye un punto de partida para la realización de futuras investigación en el campo del fármaco toxicología y el reemplazo de técnicas invasivas que perjudican al sujeto de experimentación.

1.5. Limitaciones de la investigación.

- Se trabajó en base al extracto etanólico de raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturrumasa” mediante el método de Het – Cam en huevos de gallinas fértiles.
- Se realizó la investigación en el laboratorio de especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega y en los laboratorios de la Facultad de farmacia y bioquímica de la Universidad de Nacional Mayor de San Marcos

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación.

2.1.1 Antecedentes Nacionales:

Churampi M. (2015), presento el estudio titulado; “Determinación de la Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” y su uso como activo biológico en industria cosmética”.

Su objetivo fue comprobar el efecto antiinflamatorio de extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” y uso en la cosmética como activo biológico para la industria utilizando el fruto del “tumbo serrano”.

Señalan que en la medicina tradicional la *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” es una especie autóctona del Perú empleado por su utilidad en la salud y por su valor nutritivo, ya que presenta propiedades farmacológicas en gran cantidad de compuestos polifenólicos esencialmente de flavonoides encargado de la capacidad antioxidante.

Para determinar el efecto antiinflamatorio y su uso como activo biológico el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano”, se emplea la matriz práctica: edema

Auricular inducido por TPA y su uso como activo biológico en la industria cosmética a través de ensayos de seguridad in vitro por el método potencial de irritación y el método Het - Cam.

En la cantidad dosificada de 500 1000ug. La *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” presentó actividad antiinflamatoria al 20% del extracto etanólico. Se vio ligero el potencial irritante en el ensayo de seguridad in vitro.

Concluyendo que la parte experimental analizada del extracto etanólico de la de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” presentó actividad antiinflamatoria y es válido como activo biológico en la industria cosmética. ⁽⁷⁾

Fernández A. et.al. (2014), Presentaron el estudio titulado; “Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM”.

El objetivo del trabajo fue contribuir a la información toxicológica mediante la prueba de Het- Cam; Fluconazol 2 mg/mL y Voriconazol 10 mg/mL son utilizados para fabricar colirios para la terapia de queratitis fúngica ya que fue preparado en los servicios de farmacia galénica.

Se concluye argumentado que pueden ocurrir daños en los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea del embrión del pollo durante la observación y el tiempo. Mientras el tiempo transcurrido es de 300segundos se calcula el índice de irritación (IS Irritación Score) por lo tanto no se obtiene IS en ambas muestras de tal manera que hay indicios de irritación aguda notablemente desde el punto de vista toxicológico se fundamenta idóneo para su uso. ⁽⁸⁾

Inocente M. et.al. (2013), presentaron el estudio titulado; “Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de *camu camu*, mediante el método Het Cam”. El objetivo como trabajo de investigación fue determinar actividad irritante del extracto de camu camu por el método in vitro y también formulaciones cosméticas de dicho extracto.

Se utilizó formulas cosméticas de extracto de camu camu abastecido por el laboratorio ARYU COSMETIC; emplearon el ensayo in vitro de la membrana corioalantoidea en huevos de gallinas fértiles Het Cam. El ensayo se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones de Medicina Tradicional y Farmacológica de la USMP, de la Facultad de Medicina Humana.

Como resultado se obtuvo que ningún cosmético con camu camu en extracto, realizó el rompimiento de membrana corioalantoidea, absorbido por el colorante (azul de tipan) detectable a 595nm.

Las conclusiones fueron que el índice de irritación establecido en el ensayo de las formulaciones cosméticas con extracto de camu camu aprueba determinarlas como no irritantes, y constituyen al sostén de la inocuidad para pruebas posteriores por eficacia clínica etanólico ⁽⁹⁾

Mendoza D. et.al. (2013), presentaron el estudio titulado; “Composición química y capacidad anti-irritante de extractos de cuerpo entero de *ulomoides dermestoides* (coleoptera, tenebrionidae)”. El objetivo fue evaluar la composición química de los extractos hexánicos y metanólicos de u. dermestoides y determinar su efecto anti-irritante.

La determinación de la composición química de extractos metanólicos y hexánicos realizada por (cromatografía de gases) unida a espectrometría de masas “CG-EM” y la acción anti-irritante fue valorada a través de la prueba de

irritación de la membrana corioalantoidea de huevos fértiles de gallina (HET CAM).

El índice de irritación IR se expresa como resultado

Establecieron VI mezclas generales de los dos extractos realizados: ácidos grasos, palmítico, esteárico, linoleico, oleico y limoneno.

Además en el extracto metanólico se atinó: (pentadecanol, alfa- pineno, beta-felandreno y alfa-terpineno); en el extracto hexánico:(2-metil-p-benzoquinona, 2,4-dihidroxi-1-etilbenzeno, 2,5-dimetil-quinona), alcoholes e hidrocarburos (saturados e insaturados).

El extracto metanólico revelo actividad anti – irritante potencial en el ensayo de HET CAM “IR = 3,09 ± 0,11”, semejaste al observado con el medicamento Nimesulida “IR = 2,05 ± 0,14”; AINES un antiinflamatorio no esteroideo, utilizado a modo de control positivo de la inhibición de la irritación, de tal manera que extracto hexánico no determino capacidad anti – irritante.

Concluyendo con la investigación determinaron la acción anti-irritante los extractos metanólicos de U. dermestoides. Lo cual podría asignarse como compuestos con acción antiinflamatoria como ácido oleico y linoleico. ⁽¹⁰⁾

Gonzales C. et.al. (2010); presentaron el estudio titulado “Evaluación de la irritabilidad oftálmica *in vitro* de dos cremas cosméticas de origen natural”. El objetivo del trabajo fue evaluar a las dos cremas cosméticas la irritabilidad oftálmica mediante el método in vitro.

Se demostró que mediante el método in vitro ambas cremas no presentan irritación para el ojo. ⁽¹¹⁾

Gonzales C. et.al. (2011); presentaron el estudio titulado **“Evaluación de la irritabilidad oftálmica de la *Spirulina platensis* por un método.** El objetivo de este trabajo es determinar por el método Het -Cam la irritación oftálmica de la *Spirulina platensis*.

El Producto determinado para el beneficio de seres humanos, es la *Spirulina platensis* y se hace vital determinar su potencial como irritante oftálmico dado a diferentes aplicaciones , así como su empleo en el proceso beneficioso e investigativo que conlleva al riesgo de exposición accidental en las estructuras oculares .

El método in vitro fue utilizado en la investigación es Het- Cam para valorar la irritabilidad oftálmica de la materia prima pulverizada, el procedimiento se fundamenta en aplicar el producto en la membrana corioalantoidea de huevo de gallina ya que es una estructura vascularizada y por su peculiaridad estructural es semejante a tejidos altamente vacularizados como la membrana ocular. Así mismo es apto de argumentar el efecto irritante de distintos productos. Estas peculiaridades permiten a que el método Het Cam es una alternativa al tradicional método de Draize.⁽¹²⁾

Taype E. (2015), presentó el estudio titulado; **“Estandarización y validación del método de Het- Cam para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de los cinco frutos nativos del Perú”** el objetivo de este trabajo estandarizar y validar el método HET CAM cuantitativo (CAM- TBS) en V frutos oriundos del Perú.

La investigación proporciona antecedentes científicos de los métodos HET CAM cualitativo HET CAM cuantitativo CAM-TBS, determinado en frutos oriundo del Perú, esto debe desarrollarse intensamente como un alternativo método de la prueba de Draize. La determinación de frutos fueron *“Passiflora mollisima HBK”*

(Tumbo serrano), "*Physalis peruviana* L." (Aguaymanto), "*Myrciaria dubia* L." (Camu camu), "*Mauritia flexuosa* L." (Aguaje) y "*Solanum sessiliflorum* D". Cocona).

Estos frutos nombrados habitualmente empleados en las formulaciones de la industria cosmética.

La elaboración de extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicósidos. Se llevó a cabo el procedimiento de validación y estandarización. Se desarrolló La investigación en el laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (USMP) como Centro de Investigación y en las instalaciones de la empresa privada (Ingenioidea SAC), localizadas en Lima, (Perú). En la validación del ensayo de HET CAM cualitativo CAM-TBS se determinó los parámetros sometidos a ensayos estadísticas demostrando que el método HET CAM cuantitativo otorga para la medida de la irritabilidad ocular in vitro es recto, preciso y esencial pero no fuerte. ⁽¹³⁾

Flores R. et.al. (1986), presentaron el estudio titulado; “Estudio químico de *Rumex crispus*”. El objetivo del trabajo fue el estudio de *Rumex crispus* de la familia de poligonáceas.

Los taninos y antraquinonas son fuente natural para el estudio de *Rumex crispus* ya que pertenece a la familia de poligonáceas. Del grupo de antraquinonas tenemos a la antraquinona compuesto más sencillo y eficaz, sustancia para la elaboración de un gran grupo de pigmentos y por el otro lado los taninos son constituyentes notables como sustancia curtiente y producto nativo obtenido de la corteza y frutos de diversos vegetales.

Al analizar la separación del preparado que muestra características tintóreas con el ensayo la cual se usa una técnica para disminuir un compuesto quinoideo. Se llegó a obtener dos fases; en la fase superior color rojizo y en la

parte inferior color amarillento, se quedó con la fase orgánica cuando se dividieron las dos fases, se añadió ácido clorhídrico y el etanol absoluto ya que los reactivos lo acidularon durante el baño de hielo, hasta formarse cristales amarillentos a cual se le designa producto I, ya que presenta escamas muy pequeñas al secarse. El extracto etéreo de raíz de "*Rumex crispus*" se ha aislado el producto I con punto de fusión 267°C, el cual corresponde a la 1, 6, 8- trihidroxi-5, 7-dicloro-3-metilanttraquinona. ⁽¹⁴⁾

Moncayo s. et.al. (2012), presentaron el estudio titulado; "Determinación preliminar de fitoconstituyentes presentes en las hojas de *Rumex crispus* L. (lengua de vaca) procedente del distrito de Otuzco - La Libertad". El objetivo de este trabajo es establecer los Fitoconstituyentes de las hojas de "*Rumex crispus* L". procedente del departamento - Libertad.

La investigación de plantas medicinales de forma fitoquímica está tomando un éxito sorprendente ya que el uso es de diversas plantas naturales y medicinales con fines terapéuticos dan lugar a la utilidad de dichos recursos naturales ya que es de suma importancia realizar investigaciones científicas para respaldar la efectividad, seguridad y validez de la función alopática de la planta la usuario.

Su estudio fitoquímico determina el principio activo de distintas plantas con una principal actividad biológica, las cuales producen una acción fisiológica beneficioso o tóxico al cuerpo humano. El propósito de esta investigación fue determinar los fitoconstituyentes de la planta "*Rumex crispus* L." (Lengua de vaca) procedente del distrito de Otuzco departamento, La Libertad por medio del screening farmacológico preliminar de la Dra. Miranda Martínez M. y Cuellar A; Elaborando la extracción de principio activo a partir de 1kg de "*Rumex crispus* L". Molido y muy seco para posteriormente empezar aislar con solventes de distinta polaridad; diclorometano, etanólico y acuoso para la determinación de los fitoconstituyentes fueron reactivos: flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, aminoácidos, quinonas, triterpenos y

esteroides, saponinas, aminoácidos y antocianidinas reactivos de coloración y precipitación. ⁽¹⁵⁾

Moncayo s. et.al. (2014), presentaron el estudio titulado; “Determinación de fitoconstituyentes del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus L.* (lengua de vaca) y su efecto antibacteriano in vitro frente a *Escherichia coli* y *staphylococcus aureus*”.

El objetivo de este trabajo es determinar los fitoconstituyentes de la raíz de *Rumex crispus L.* y su actividad antibacteriana por el método in vitro frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En el estudio se trabajó con la raíz de *Rumex crispus L.* su elaboración fue extracto etanólico planta procedente de la provincia Otuzco, departamento La Libertad.

Se elaboró mediante reflujo el extracto etanólico, por lo cual se le realizó la identificación de fitoconstituyentes, obteniendo la presencia de azúcares reductores, quinonas, catequinas, lactonas, saponinas, flavonoides, antocianidinas, compuestos fenólicos y taninos. Mediante la técnica de difusión se determinó el efecto antibacteriano in vitro en pozos de agar basada en el método de Kirby- Bauer modificado. El extracto etanólico de las hojas de “*Rumex crispus L.*” presentó actividad antibacteriana in vitro frente a *Escherichia coli* ATCC 25992 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las concentraciones de (5%, 15% y 30%, demostrando mayores porcentajes de inhibición (83% y 59%), a la concentración de 30%, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). De igual manera la concentración mínima inhibitoria frente *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fue de 2.5 mg/mL y 1 mg/mL respectivamente. ⁽¹⁶⁾

2.1.2 Antecedentes Internacionales:

Rodríguez M. et.al. (2011), presentaron el estudio titulado; “Determinación de la actividad anti-irritante del extracto etanólico de raíz de *Cnidoscolus urens* L.” el objetivo de este trabajo es determinar la actividad anti-irritante del extracto etanólico de la raíz de *Cnidoscolus urens* mediante el ensayo Het Cam.

Se realizó un preparado etanólico de la raíz de *Cnidoscolus urens*. Se realizó el ensayo de cromatografía en capa fina donde se pudo determinar algunos compuestos químicos. En la prueba preliminar del ensayo HET-CAM se estableció que el preparado etanólico tiene efecto anti-coagulante y anti-hemorrágica, a un que no tiene actividad anti-vasodilatadora a una concentración de (10mg/mL) de solución salina.

Concluyendo que la especie *Cnidoscolus urens* no tiene efecto anti irritante, anti-hemorrágica y anticoagulante pero no tiene efecto anti-vasodilatadora del extracto etanólico de raíz determinada. ⁽¹⁷⁾

Batista J. (2013), presentó el estudio titulado “Métodos alternativos para la Evaluación Inmunotoxicológica de Adyuvantes Vacúnales”. El objetivo de este trabajo es determinar métodos alternativos para los ensayos Inmunotoxicológicos de Adyuvantes Vacúnales.

En el estudio se evalúan tres métodos alternativos : el HET-CAM, un ensayo in vitro para la detección de irritabilidad directa y su inserción en una investigación preclínico de balance eficacia-toxicidad; las herramientas bioinformáticas (in sílico) para determinar el mimetismo molecular entre antígenos vacúnales y proteínas humanas, evaluando la capacidad de

autoinmunidad a nivel preclínico; y por último se elabora un biomodelo cinético de teofilina plasmática en ratas, para determinar la reacción de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre medicamentos que se metabolizan por vía citocromo P450.

Para estas pruebas se emplearon adyuvantes en desarrollo como: AFCo1, Cliptox, Montanide IMS 1313 y 1314, así como los ya establecidos adyuvantes de Freund e hidróxido de aluminio. Se observó la utilidad del HET CAM para estudios de irritabilidad directa a los adyuvantes y como parte de los ensayos preclínicos; de igual manera se indica que la detección del mimetismo molecular entre antígenos vacunales y proteínas humanas es de gran valor, pero su alcance para la predicción de autoinmunidad a nivel preclínico es limitada y por último, se evidencia que un biomodelo cinético de teofilina es potencialmente importante para constatar el efecto de la inmunoestimulación por adyuvantes sobre la concentración plasmática de este fármaco. ⁽¹⁸⁾

Murillo P. et.al. (2011), presentaron el estudio titulado “Incorporación de II Ensayos Alternativos para determinar Irritación ocular. El objetivo para este trabajo es determinar la irritación ocular en métodos in vitro.

Para determinar e identificar el porcentaje de irritación ocular de las sustancias químicas y formulaciones se realizaron dos pruebas alternativas en el laboratorio utilizando animales; en uno de ellos se emplea eritrocitos bovino y en el otro la membrana corioalantoidea del huevo embrionado, incubado por diez días.

En los protocolos respectivos de referencia se halló el potencial de irritación de sustancias y también se determinó correspondencia de datos ya que su clasificación de sustancias fue simillas a la referida.

El hidróxido de sodio, cloruro de benzalconio, lauril sulfato de sodio fueron irritantes ya que el polietilen-glicol no resulto irritante.

Este proceso también se logra en estudios en vivo, así mismo se obtiene resultado fiable. Estos métodos son módicos, rápidos y factibles en su elaboración, comparando con el ensayo que se realiza en conejos.(19)

Corrado, M. (2007), presentó el estudio titulado; “Ensayos Toxicológicos Utilizados en el Control de Calidad de Productos que han sido Cuestionados por Grupos Defensores del Bienestar de animales por llevar al Sacrificio y Sufrimiento Injustificado de un número Extraordinario de animales”. El objetivo de este trabajo es determinar métodos alternativos para evaluar el potencial de irritación.

Como método alternativo a la prueba de Draize (irritación ocular en conejos) el método HET-CAM (membrana corioalantoidea) ensayo en el huevo de gallina fértil incubado por 10 días.

Se evaluó el potencial de irritación de dentífricos de uso adulto, incautados por municipales de salud; adquiridos en comerciantes del rio de Janeiro.

El ensayo se realizó con el método HET CAM y prueba in vivo de la irritación de la mucosa oral.

Dependiendo si potencial irritante un producto se determina como no irritante (NI), mínimamente irritante (IMIN), irritante leve (IL), irritante máximo (IM) e irritante severo (IS) y para la prueba in vitro se hizo el método oficial de evaluación del potencial de irritante del huevo de pollo, teniendo como principio la observación de los efectos irritantes cuando entran en contacto con la membrana corioalantoidea del huevo fértil, incubado por diez días. ⁽²⁰⁾

2.2 Bases legales

2.2.1 Normas Nacionales.

LEY N^a 30407

LEY DE PROTECCIÓN Y BIENESTAR ANIMAL

Artículo 19. Centros que utilizan animales en actos de experimentación, investigación y docencia.

Todo experimento, investigación y docencia con animales solo puede tener lugar en centros de educación superior y centros especializados públicos y privados que cuentan con comités de ética de bienestar animal únicamente cuando los resultados de estas actividades no puedan obtenerse mediante otros métodos que no incluyan animales y garanticen la mayor protección contra el dolor físico.

Las medidas de bienestar de animales utilizados en actos de experimentación, investigación y docencia están basadas en las buenas prácticas de manejo, bioseguridad y bioética de acuerdo con la especie animal, las cuales deben especificarse por el ministerio de agricultura y riego. ⁽²¹⁾

Artículo 20. Comité Nacional de ética para el Bienestar Animal.

el comité nacional de ética para el bienestar animal está conformado por seis integrantes: un representante de la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre del ministerio de agricultura y riego, un representante del ministerio del ambiente, un representante de la autoridad nacional en sanidad agraria, un representante del consejo nacional de ciencia, tecnología e innovación tecnológica (CONCYTEC), un representante del colegio médico veterinario del Perú y un representante del colegio de biólogos del Perú.

El comité nacional de ética para el bienestar animal está encargado de evaluar los criterios usados por los comités de ética de los centros para establecer los parámetros de bienestar animal, basado en los criterios aceptados internacionalmente para este fin. ⁽²²⁾

2.2.2 Normas Internacionales.

México; Ley general de salud, Última reforma DOF 27-01-2017

México: decreto de ley de protección a los animales del distrito federal; artículo 4.

2.3. Bases teóricas.

2.3.1. Bases teóricas de la variable” Extracto etanólico de raíz, tallo, hojas, de *Rumex crispus* L. "Cuturumasa”.



FUENTE: Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines (56)

FIGURA 1. *Rumex crispus* L.(cuturumasa)

2.3.1.1. Descripción general de la planta.

Rumex crispus L. Conocida popularmente con el nombre “Cuturumasa” es una planta Nativo con escasos registros de uso medicinal e investigaciones farmacológicas, razón por la cual es el interés, con el fin de demostrar la actividad irritante ocular in vitro. Es una especie de plantas con flores perteneciente a la familia Poligonácea conocida por varios nombres comunes oreja de vaca y acelera. Es originaria de África, pero es cultivada como planta ornamental de otras partes del mundo.

Especies similares “Muelle encrespada (*Rumex crispus*) se puede distinguir de otros muelles (*Rumex spp.*) Y la acedera (*Acetosella vulgaris*) por la forma de sus frutos. Acedera (*Acetosella vulgaris*) tiene fruta sin proyecciones, pantano muelle (*Rumex brownii*) tiene fruta con 4-6 dientes pequeños en forma de gancho alrededor de 1 mm de largo, menor muelle hirsuto (*dumosiformis Rumex*) tiene fruta con dos largos dientes (3-4 mm de largo) a cada lado, mientras que el fruto de muelle curvado (*Rumex crispus*) son ampliamente alada.

(23)

2.3.1.2. Distribución botánica.

Se encuentra ampliamente distribuido en todo el sur y este de las islas canarias. “Esta especie es muy común en Victoria, al este de Nueva Gales del Sur, Tasmania, al sur-este de Australia del Sur, el sudeste de Queensland y el suroeste de Australia Occidental”. Además está presente en lugares como Queensland y Nueva Gales del Sur y ha sido registrado en el Territorio del Norte. “También ampliamente naturalizada en otras partes del mundo, incluyendo

África tropical, La Reunión, Papúa Nueva Guinea, Nueva Zelanda, América del Norte, América Central, América del Sur y en muchas islas del Pacífico (por ejemplo, las Islas Galápagos, Fiji, Polinesia francesa, Nueva Caledonia y Hawai.”⁽²²⁾

En el Perú localizado en toda la sierra desde Cuzco hasta Puno. Frecuentemente en la sierra central en el Valle del Mantaro.

2.3.1.3. Identificación taxonómica.

Reino: PLANTAE
División: MAGNOLOPHYTA
Clase: MAGNOLIOPSIDA
Orden: POLYGONALES
Familia: POLYGONACEAE
Género: *Rumex*
Especie: *Rumex crispus* L.

2.3.1.4. Descripción física de la planta.

“Es una planta de 1.5 m de altura herbácea y que puede vivir muchos años se forma una roseta basal de hojas al principio, y después produce en posición vertical floración tallos con racimos de flores muy ramificado”.⁽²²⁾

“Una planta herbácea de larga vida formando una roseta basal de grandes hojas rizadas al principio. El tiempo se produce una serie de frondosos tallos verticales, que se ramifican en inflorescencias densamente agrupados”.⁽²³⁾

La raíz es pivotante, amarillenta o anaranjada, hasta de 30 cm de largo, provista de varias raíces laterales más bien gruesas.

El tallo tiene rayas longitudinales, simple o, como hemos dicho, con ramificaciones en la parte superior.

Hojas estrechas y lanceoladas, normalmente de margen ondulado. Las basales con pecíolos largos, lanceoladas a oblongo-lanceoladas, de 10 a 30 cm de largo, borde frecuentemente ondulado, con la venación manifiesta, las hojas superiores más reducidas.

La inflorescencia, con las flores (de colores rosáceos) verticiladas y dispuestas en panículas densas, estrechas, alargadas, ascendentes, de 10 a 50 cm de largo, pedicelos florales de 5 a 10 mm de largo, articulados cerca de la base. Segmentos periánticos de fruto acorazonado, entero, con tres (raramente una) protuberancias.

Semillas dispersadas en aquenios rodeadas por el perianto seco,



caedizo al frotar. Aquenio de contorno ovado de 2 a 3 mm de largo y 0.9 a 1.7 mm de ancho, trígonos, superficie punctulada casi lisa, lustrosa, color pardo a pardo oscuro cuando está maduro y albo si está tierno).

FUENTE: wisflora herbarium medicines

FIGURA 2. *Rumex crispus* L.(cuturru-masa)

2.3.1.5. Propiedades curativas.

La parte más empleada es la hoja y el tallo, en infusión tomada como se te y en emplastos se utiliza como antiinflamatorio, antianémico, cicatrizante, laxante, estimulante de las defensas orgánicas, y también se puede atribuir la acción de diurético.

2.3.1.6. Metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios son también llamados Productos Naturales, no son universales, cada planta en sus distintos órganos (flor, hoja, tallo, raíz) tienen diferentes tipos de compuestos químicos con actividad terapéutica, cosmética u astringente, las plantas son auto constructoras de su propio alimento mediante la fotosíntesis. ⁽²³⁾

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario pero de limitada distribución en el reino de las plantas, restringidos a un grupo taxonómico particular (Shilpa et al., 2010). Los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos (Bourgaud et al., 2001). Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas (Wink, 2007). Además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos (Goossens et al., 2003).

Los metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular. La formación de los metabolitos secundarios en la naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios. La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Existen tres intermedios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupo de productos naturales como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etc. Algunos esqueletos de productos naturales se biosintetizan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica tal es el caso de los flavonoides que se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico. A estos compuestos se les denomina de biogénesis mixta. (21)

2.3.1.7. Tipo de metabolitos secundarios básicos.

El porcentaje de los principios activos de especies está comprendido dentro de productos naturales o metabolitos secundarios que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, de distribución restringida y características botánicas.

Los metabolitos secundarios de acuerdo a sus grupos funcionales se clasifican en tres partes los cuales son: terpenoides y esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides.

a. Compuestos terpenoides y esteroides.

“al hablar de terpenoides se refiere a un grupo de sustancia que tiene un origen biosintético común y que siguen la llamada regla de isopreno esbozada por Wallach en 1886.

La unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono múltiplos; (hidroxilos, cetonas, aldehídos) y se la conoce como isopreno.

b. Compuestos fenólicos.

Comprenden los fenilpropanos y los flavonoides. Los flavonoides se clasifican a su vez en flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, chalconas y auronas.

c. Alcaloides.

Los cuales se dividen en alcaloides verdaderos, protoalcaloides, pseudoalcaloides y alcaloides imperfectos.

2.3.1.8. Registro de campo (ubicación geográfica).

Rumex crispus L. “cuturumasa”. Se recolectó en el departamento de Junín, Provincia de Jauja, Distrito de Molinos en el mes de junio del 2017 a una altitud de 3.340 m.s.n.m. Se realizó el estudio respectivo en el laboratorio fitoquímico de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, así mismo también en el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Farmacéutica y Bioquímica en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

a. Método de extracción.

Extracción por maceración conocido en el área de fitoquímica.

Maceración: el órgano (raíz, tallo y hojas) triturado se pone en un solvente etanólico o hidroalcohólico se guarda en un frasco de 2 a 14 días; agitándose constantemente. La mezcla es filtrada para obtener una mayor concentración de soluto.

b. Clasificación de extractos vegetales.

Dependiendo al concentrado de los extractos, se clasifican en (extractos líquidos, extractos semisólidos, o blandos y extractos secos).

c. Preparación de extractos.

Extracto seco:

Se obtiene adquiriendo los principios activos con solventes apropiados, y evaporando éste casi en su totalidad. El objetivo es conservar los ingredientes en forma concentrada, uniforme y apropiada para usada como medicamento.

La materia seca o extracto seco es la parte que resta de un material tras extraer toda el agua posible a través de un calentamiento hecho en condiciones de laboratorio. Es una noción usada principalmente en biología y agricultura.

El procedimiento consiste en pesar la *materia fresca* (en su estado natural), y someterla a un secado por calentamiento en un horno de laboratorio, llegando a una temperatura de entre 103 y 105 °C (en el caso de los alimentos) mientras que el tiempo que dura el calentamiento dependerá de cada sustancia. Una vez pasado el tiempo de calentamiento se pesa el residuo, que será la materia seca.

Al mismo tiempo que se extrae toda el agua posible, desaparecen de la muestra los compuestos orgánicos volátiles como el amoníaco y el alcohol.

d. Concentración de extractos.

Este proceso se hace con presión disminuida baja temperatura para la salida de solventes se emplea el rota vapor como una alternativa para realizar este tipo de trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores)

e. Tamizaje fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico es una técnica analítica sobre la tintura de la planta preparada mediante la aplicación de reacciones químicas de coloración y precipitación para la detección de componentes químicos de determinada estructura y se confirman con otras técnicas analíticas como la cromatografía. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del “screening” farmacológico. Así, cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y

presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse la presencia de flavonoides en el “screening” fitoquímico y una acción antiinflamatoria en el “screening” farmacológico, esta última puede asociarse a la fracción de flavonoides. Esta fracción puede, entonces, ser aislada y sometida a pruebas más específicas.

El método permite determinar la presencia de los principales grupos de compuestos químicos, tanto libres, como en la forma de glicósidos.

Determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. La evaluación debe de ser permitida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

e.1 Metodología en el análisis fitoquímico.

Un análisis fitoquímico debe de comprender cuatro etapas bien definidas:

- Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio.
- Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos.
- Determinación estructural.
- Ensayos farmacológicos o toxicológicos.

e.2 Reacciones de identificación.

Consiste en realizar una serie de reactivos, que identificar cada metabolito secundario que esté presente en el extracto a investigar.

- Ensayo de Sudan.
Determina compuestos grasos, la presencia de una película coloreada de rojo es positiva.
- Ensayo de Borntrager.
Se determina quinonas, dando positivo el color (rosado, rojo)
- Ensayo de Liberman Buchard.
Determinar triterpenos y/o esteroides, es positivo el cambio rápido de coloración; rosado, azul, verde, negro.
- Ensayo de Molish
Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos de tipo pirocatecólicos.
Desarrollo de una coloración azul, taninos de tipo pirogalotánicos.
- Ensayo de Shinoda
Permite conocer la presencia de flavonoides. Se la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

- Ensayo de mucilagos: la presencia de polisacáridos, que forman un coloide hidrófilo.

2.3.2. Bases teóricas de la variable Actividad irritante ocular in vitro por el método Het – Cam.

a) Ensayo in vitro Irritabilidad ocular

El ensayo de la membrana corioalantoidea conocida como Het- Cam en un método propuesto (Luepke), modificado por (Spielmann) y por (Steiling) que permite estimar el potencial de irritación ocular in vitro de sustancias y productos terminados. A partir del establecimiento de estos protocolos, el método del Het- Cam como sustituto al test de Draize que ha sido uno de los más utilizados.

- **Método Het – Cam (membrana corioalantoidea del huevo fértil de gallina)**

El método Het- Cam nos permite identificar las reacciones de irritación que es semejante a las que ocurre en el ojo de conejo usado en el test de Draize. Entidades regulatorias de diferentes países han

aprobado este método por su capacidad de similitud y predictiva con los métodos tradicionales, además porque la prueba presenta un bajo costo y una sencilla determinación.

El procedimiento del método Het- Cam, se determinan tres reacciones: hemorragia, lisis y coagulación de la membrana corioalantoidea al noveno día de embronación cuando el tejido nervioso y la percepción del dolor aún no se han desarrollado.

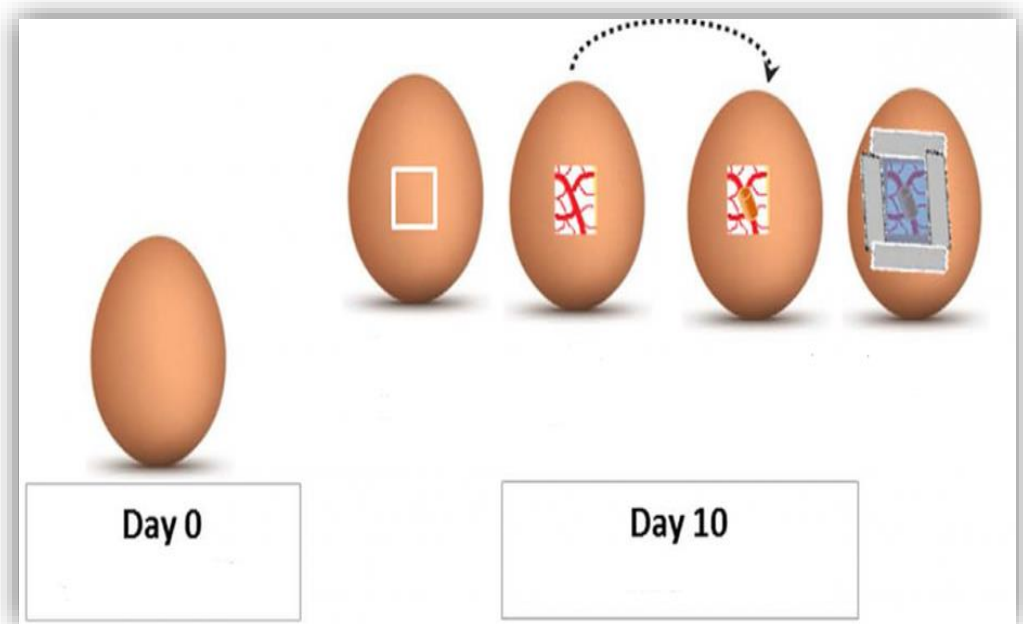
La Membrana cori alantoidea es un tejido atiborrado que contiene venas, arterias y capilares, también de ser técnicamente sencillo para ser estudiado. Da respuesta a lesiones con procesos inflamatorios parecidos a los observados en el tejido conjuntival de los ojos de los conejos. Para estudios de irritación ocular su vascularización es bien desarrollada e ideal.

El test de irritación ocular Het - Cam es un método utilizado para evaluar la irritación potencial de productos cosméticos y productos naturales.

“Para la determinación se usan huevos de gallina fértiles, sobre la capa corioalantoidea, la cual contiene vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares), el nivel de irritación se determina a través del proceso inflamatorio sufrido, midiéndose el tiempo de aparición de los efectos observables sobre dicha membrana (hemorragia, lisis vascular y coagulación) durante 5 min”. La velocidad de aparición y la intensidad de daños y lesiones son prueba del potencial irritante del constituyente evaluado.

“El ensayo de la membrana corioalantoidea (MCA) del huevo de gallina, conocido por las siglas Het - Cam de su nombre en inglés (hen’s egg test on chorioallantoic membrane) es una prueba que permite estimar in vitro el potencial de irritación ocular de sustancias y productos terminados. Introdujeron una variante a esta técnica, que

consiste en el uso de un colorante y la lectura espectrofotométrica de la muestra, suprimiendo así el carácter subjetivo del resultado”. A partir de estos protocolos para establecer el ensayo del Het - Cam como sucedáneo del método de Draize ha sido el más estudiado, en varias investigaciones de validación. “Het - Cam, es un método sencillo y reproducible, que no necesita de equipamiento especial, todo lo cual lo convierte en un procedimiento asumido por muchos laboratorios, particularmente los de la industria cosmética, en la evaluación toxicológica preliminar de sus productos”. (25)



FUENTE: Investigators of Regenerative Medicine) meeting(36)
Figura 3. huevo de gallina fértil (*Gallus gallus domesticus*)

2.4. Formulación de hipótesis.

2.4.1. Hipótesis general

1. El extracto etanólico de raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. "Cuturumasa" presenta actividad irritante ocular in vitro por el método de Het Cam.

2.4.2. Hipótesis específicas.

1. El extracto etanólico de raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. "Cuturumasa" tiene metabolitos secundarios que se pueden definir mediante su perfil fitoquímico.
2. Los metabolitos de raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. "Cuturumasa" evaluado tiene actividad irritante ocular mediante el método de Het Cam.

2.5. Operacionalización de variables e indicadores.

VARIABLES

Variable independiente

- Extracto etanólico de raíz, tallo y hojas, de *Rumex crispus* L. "Cuturumasa".

Variable dependiente

- Actividad irritante ocular in vitro método Het – Cam

INDICADORES: (VI)

- Hojas alternas; peciolo largo, áspera, base redonda, borde ondulado
- Determinación: color, sabor, olor
- Grado de solubilidad
- Marcha fitoquímica

INDICADORES:(VD)

- Lesión o daño a la membrana corioalantoidea.

2.6. Definición de términos básicos.

- **Embrión**
Se denomina embrión a un organismo multicelular que se encuentra en las primeras etapas de desarrollo. “En los organismos con reproducción sexual , la fusión de espermatozoides y del huevo en un proceso llamado fertilización , determina la formación de un cigoto , que contiene una combinación de ADN de ambos padres.”
“Justo después de su formación, el cigoto comienza un proceso de división, que produce un aumento en el número de células, llamadas blastómeros . Después de que comienza el proceso de diferenciación celular que determinan la formación de los diferentes órganos de acuerdo con un patrón establecido para dar lugar a un cuerpo final.”
“Frente a este proceso de diferenciación celular pueden distinguir tres etapas: la etapa de blastocito , la gastrulación y organogénesis .”

Al finalizar el desarrollo embrionario , el organismo resultante se llama feto y completar su crecimiento hasta el momento del nacimiento.
(26)

- **Incubación**

Es el proceso de incubación de huevos

“La incubación es el acto por el que los animales ovíparos (sobre todo las aves) empollan o incuban los huevos sentándose sobre ellos para mantenerlos calientes y así se puedan desarrollar los embriones.” (26)

- **Irritación aguda**

“Es un estado inflamatorio o una reacción dolorosa del organismo causados principalmente por algún tipo de alergia a agentes químicos o a otros estímulos (pe: el calor o la luz ultravioleta). Se puede sufrir una irritación en diferentes partes del cuerpo: los ojos, la nariz, los intestinos (colon irritable), la piel.” (26)

- **In vitro**

“Técnica controlada de experimentación en un tubo de ensayo y ambiente acondicionado y controlado fuera de un organismo vivo. La fecundación *in vitro* es un ejemplo ampliamente conocido”. (27)

- **Membrana corioalantoidea:**

“ La CAM es una membrana extraembrionaria, originada como una extensión del endodermo del embrión de reptiles, aves y mamíferos. Situado caudalmente al saco vitelino. Inicialmente el alantoides circula al embrión entre el amnios y el corion.” “Conforme avanza el desarrollo embrionario va disminuyendo de tamaño transformándose en un saco alargado originado en el tallo del cuerpo del embrión y forma parte del cordón umbilical”. (27)

- **Prueba de Draize:**

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

“El procedimiento, que se usaba inicialmente para probar cosméticos, consiste en la aplicación de 0,5 ml o 0,5 g de una sustancia de prueba en el ojo o en la piel de un animal consciente e inmovilizado, dejarla durante un periodo de tiempo, y después enjuagarla y tomar nota de sus efectos.” Los animales son observados durante un máximo de 14 días en busca de señales de eritema y edema en la prueba para piel; y de enrojecimiento, inflamación, secreción, ulceración, hemorragia, opacidad o ceguera en la prueba ocular. Por lo general, el sujeto de prueba es un conejo albino, aunque otras especies, incluyendo perros pueden ser utilizadas. Los animales son sacrificados tras la prueba si se determina que ésta les causó daños irreversibles en la piel o los ojos, y pueden ser reutilizados si el producto probado no les causó daños permanentes; en ese caso, su reutilización se da luego de un periodo "de limpieza" en el que se garantiza que no quedan trazas del producto.”

“Las pruebas son polémicas. Son vistas como crueles y poco científicas por críticos debido a las diferencias entre los ojos de los conejos y los humanos, y la naturaleza subjetiva de las evaluaciones visuales. La FDA apoya las pruebas, indicando que "a la fecha, ninguna prueba o batería de pruebas ha sido aceptada por la comunidad científica como un reemplazo la prueba de Draize". Debido a su naturaleza controversial, el uso de esta prueba ha declinado en los últimos años en Estados Unidos y Europa, y en ocasiones es modificada para que

utilice anestesia y dosis menores de la sustancia de prueba. Además, las sustancias químicas que hayan demostrado causar efectos adversos en pruebas *in vitro* no se utilizan en pruebas de Draize, reduciendo así la cantidad y severidad de las pruebas realizadas".⁽²⁸⁾

- **Cámara de aire del huevo:**

Espacio vacío formado entre la albúmina (clara) y la cáscara en el extremo más ancho del huevo. Se comienza a formar una vez que se produce la contracción del contenido del huevo al enfriarse después de la puesta. En el caso de que el huevo sufriera un proceso de incubación, esta cámara se haría mayor debido a la evaporación y absorción de material por parte del embrión. Este espacio de aire es vital para el desarrollo del embrión: permite la evaporación dentro de una estructura rígida, es útil al polluelo para su movilidad y sirve para respirar cuando rompe la membrana interior antes de eclosionar. Revisar el tamaño de esta cámara de aire durante la incubación es importante para hacer algún cambio en este período.⁽²⁹⁾

- **Huevo de gallina fértil:**

El ovulo ha sido fecundado, en el momento de la postura es un embrión con alrededor de 50.00 células. Se forma de blastodesmo con área interna o pelucida y un área externa u opaca.⁽²⁹⁾

- **Blastodermo:**

Formado por vesícula germinal, rodeado de periblasto en el que se encuentra las lagunas del periblasto que son observables mediante lupa.⁽²⁹⁾

- **Taxonomía:**
Ciencia que trata de métodos, principios y clasificación generalmente científica; se aplica en especial, dentro de la biología para la ordenación jerarquizada y sistémica de los compuestos animales y vegetales. ⁽³⁰⁾
- **Planta medicinal:**
Recurso biológico, en algunos casos se emplea completa, en otros casos solo algunas partes, tallo, hoja, raíz, etc. de la sección seleccionada.
Se obtiene extractos que se emplean para el tratamiento de alguna afección como pudiera ser dolor estomacal, dolor de cabeza, inflamaciones, etc... Algunos lo llaman droga medicinal o remedio herbario, también se le conoce como medicina tradicional; acción terapéutica (alivio, mejora) se debe a que contiene principios activos. ⁽³⁰⁾
- **Extracto etanólico:**
Un extracto etanólico se obtiene macerando la planta aromática en etanol (alcohol etílico), por lo que sólo extraeremos los compuestos solubles en alcohol. ⁽³¹⁾
- **Extracto:**
Preparado de consistencia sólida, líquida o intermedio, derivados de generalmente de la materia vegetal desecada, obtiene al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. ⁽³¹⁾

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo y nivel de investigación.

Investigación descriptiva:

Tipo de investigación que describe de modo sistemático las características de una población, situación o área de interés.

Aquí los investigadores recogen los datos sobre la base de una hipótesis o teoría, exponen y resumen la información de manera cuidadosa y luego analizan minuciosamente los resultados, a fin de extraer generalizaciones significativas que contribuyan al conocimiento. ⁽³²⁾

Investigación prospectiva:

Este estudio posee una característica fundamental, es la de iniciarse con la exposición de una supuesta causa, y luego seguir a través del tiempo a una población determinada hasta determinar o no la aparición del efecto. Este tipo de estudio es muy utilizado en investigaciones.

Cuando se realiza un estudio prospectivo, una vez planteada la hipótesis, se define la población que participará en la observación, puede ser a partir de un grupo de edad, individuos que practican una profesión e inclusive a todo un sector o comunidad. ⁽³³⁾

Investigación cualitativa:

El método de investigación cualitativa es la recogida de información basada en la observación de comportamientos naturales, discursos, respuestas abiertas para la posterior interpretación de significados.

Mientras que los métodos cuantitativos aportan valores numéricos de encuestas, experimentos, entrevistas con respuestas concretas para realizar estudios estadísticos y ver cómo se comportan sus variables. Muy aplicado en el muestreo.

Sin embargo, el concepto de método cualitativo analiza el conjunto del discurso entre los sujetos y la relación de significado para ellos, según contextos culturales, ideológicos y sociológicos. Si hay una selección hecha en base a algún parámetro, ya no se considerará cualitativo. ⁽³⁴⁾

3.2. Diseño de la investigación.

El presente proyecto de tesis corresponde a una investigación experimental diseño cuasi experimental.

También manipulan deliberadamente, al menos, una variable independiente para observar su efecto y relación con una o más variables dependientes, sólo que difieren de los experimentos “puros” en el grado de seguridad o confiabilidad que pueda tenerse sobre la equivalencia inicial de los grupos. En los diseños cuasi experimentales los sujetos no se asignan al azar a los grupos ni se emparejan, sino que dichos grupos ya están formados antes del experimento: son grupos intactos (la razón por la que surgen y la manera como se formaron es independiente). ⁽³⁴⁾

3.3. Población y muestra.

3.3.1 Población

La presente investigación está constituida por la raíz, tallo, hojas de *Rumex crispus* L. “cuturumasa” y huevos fértiles de gallina (*Gallus gallus domesticus*).

3.3.2 Muestra

La muestra seleccionada será sometida a las operaciones de recolección, identificación y limpieza.

Conforme a los criterios de inclusión y exclusión:

- Criterio de inclusión:
 - a.- Se consideró a todos los Huevos de Gallina fértil.
 - b.- Se consideró aquellos que tuvieron el Tiempo de incubación apropiada.
 - c.- se consideró aquellos huevos que Correctamente formaron la membrana cori alantoidea.

- Criterio de exclusión:
 - a.- se rechazó los huevos demasiados pequeños.
 - b.- se rechazó aquellos que no lograron formar membrana cori alantoidea.
 - c.- se rechazó aquellos con cámara de aire pequeña.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

3.4.1. Descripción de instrumentos.

Observacional:

La observación científica es aquella que utiliza hipótesis expresas y manifiestas, a pesar de que se puedan obtener observaciones científicas por azar o no conexas con objetivos de investigación.

El principal objetivo de la observación es la comprobación del fenómeno que se tiene frente a la vista, con la preocupación de evitar y precaver los errores de la observación que podrían alterar la percepción de un fenómeno o la correcta expresión del mismo. En tal sentido, el observador se distingue del testigo ordinario, ya que este último no intenta llegar al diagnóstico, además son muchos los sucesos que le pasan desapercibidos. (32)

Entrevista:

Es la comunicación interpersonal establecida entre el investigador y el sujeto de estudio a fin de obtener respuestas verbales a los interrogantes planteados sobre el problema propuesto. Se considera que este método es más eficaz que el cuestionario, ya que permite obtener una información más completa.

A través de ella el investigador puede explicar el propósito del estudio y especificar claramente la información que necesite; si hay interpretación errónea de las preguntas permite aclararla, asegurando una mejor respuesta

Análisis Documental:

El análisis documental es un conjunto de operaciones encaminadas a representar un documento y su contenido bajo una forma diferente de su forma original, con la finalidad posibilitar su recuperación posterior e identificarlo. El análisis documental es una operación intelectual que da lugar a un subproducto o documento secundario que actúa como intermediario o instrumento de búsqueda obligado entre el documento original y el usuario que solicita información. El calificativo de intelectual se debe a que el documentalista debe realizar un proceso de interpretación y análisis de la información de los documentos y luego sintetizarlo. ⁽³²⁾

3.4.2. Validación de instrumentos.

Se presentó el instrumento que refleja un dominio específico del contenido de lo que se mide; previamente diseñada para la investigación titulada: “ACTIVIDAD IRRITANTE OCULAR IN VITRO POR EL METODO DEL HET – CAM DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA RAIZ, TALLO Y HOJAS DE RUMEX CRISPUS L. “CUTURRUMASA”

La cual fue calificado y respaldado por 3 expertos profesionales.

1. Dra. Q.F. Ruiz Sánchez Maritza Galine
2. Dra. Q.F. Morales Quispe Heddy Teresa
3. Dr. Q.F. Jacinto Hervias Pedro

TABLA 1. VALIDACION DE LOS EXPERTOS

VALIDADOR	PROMEDIO	PORCENTAJE 50=100%
EXPERTO 1	48	95%
EXPERTO 2	45	90%
EXPERTO 3	42	83%
TOTAL	43	87%

3.5. Técnica de procesamiento y análisis de datos.

Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se tomó el tiempo y se comparó el grado de irritación.

El análisis se realizó con Software SPSS v20 para verificar la homogeneidad. Para establecer si hubo diferencias de los grados de irritabilidad, se utilizó la prueba de índice de irritación.

CAPITULO IV

PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

4.1 Procesamiento de datos: Resultados.

1. Lugar de investigación.

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; la prueba de solubilidad y la marcha fitoquímica. De igual manera se trabajó el método Het-Cam en el laboratorio de toxicología de la Facultad de Farmacia Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

2. Preparación de la muestra.

Clasificación taxonómica

La clasificación sistemática fue estudiada según el sistema de clasificación de Cronquist (1981), el que se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se determinó por el biólogo Severo Baldeon,

Recolección

Se recolectaron 10 kilos de la especie *Rumex crispus* L. “cuturumasa” en el mes de mayo 2017, de las orillas de los ríos y puquiales del distrito de molinos, provincia de Jauja departamento de Junín. La muestra recolectada se envolvió con papel kraff y se embolsó en cajas de cartón con su respectivo rótulo.

Selección

El material vegetal recolectado se transportó al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en donde se eliminó las sustancias extrañas presentes en el material vegetal.

Lavado

Luego de la separación de las sustancias extrañas se procedió a lavar el material vegetal con agua destilada.

Deseccación

Las partes de la especie raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. (cuturrumasa) son puestas a secar a temperatura ambiente sin interacción con los rayos solares para no alterar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la especie en estudio.

Molienda

Una vez seca el material vegetal dividido por sus partes raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. (cuturrumasa) se molió con ayuda de un molino.

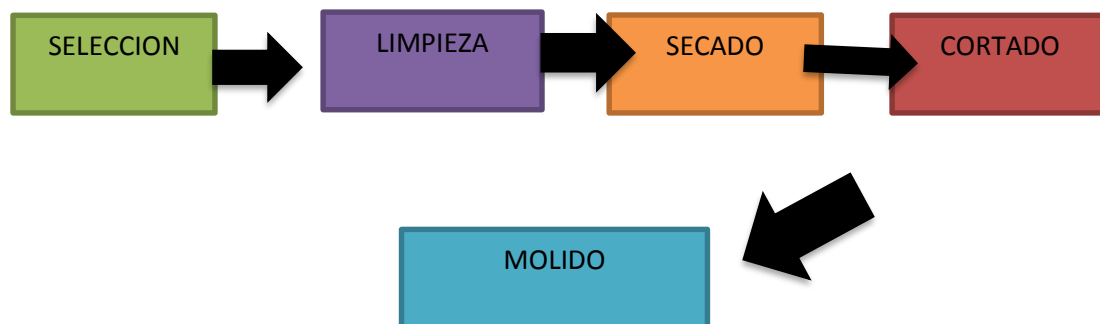


Figura 4. Flujograma preparación de muestra raíz, tallo, hojas, de *Rumex crispus* L. "Cuturrumasa"

3. Elaboración del macerado de las drogas “Tintura”.

a) Determinación del grado alcohólico.

- Se llenó 100mL de alcohol en una probeta, y con ayuda de un alcoholímetro se midió el grado alcohólico, para luego realizar la conversión.

b) Preparar alcohol de 60° a partir de alcohol de 96°.

- Este procedimiento se realizó con la fórmula de:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

- Para utilizar esta fórmula se necesitó saber cuánto de alcohol de 60° se iba a preparar; para este caso se preparó 100 mL de alcohol de 60°.
- La fórmula se expresaría de la siguiente manera:

$$96 \times V1 = 60 \times 100$$

“Cuanto de alcohol de 96° necesito para preparar 100mL de alcohol de 60°”.

$$V1 = 62.5 \text{ mL}$$

c) Pesar con exactitud la cantidad de droga fraccionada a colocar en el frasco.

- Se llenó aproximadamente hasta la mitad del frasco ámbar boca ancha.

d) Esperar unos minutos que permita hidratar la droga.

- Se mueve para aumentar la superficie de contacto entre la droga y el alcohol.
- Cerrar muy bien, etiquetar y dejar macerar 15 días.

e) Filtrado de la tintura.

- Transcurridos 15 días se procede a filtrar la tintura y se vierte en un frasco.
- Se hacen los cálculos respectivos para la determinación de la concentración y el porcentaje de pureza de la tintura.
- La concentración será igual a: peso de la droga desecada / volumen final (filtrado).

$$20 \text{ gr} / 80 \text{ mL} = 0.25 \text{ gr/mL}$$

- El porcentaje de pureza: $0.25 \text{ gr/mL} \times 100 = 25 \text{ por ciento.}$ ⁽³⁴⁾

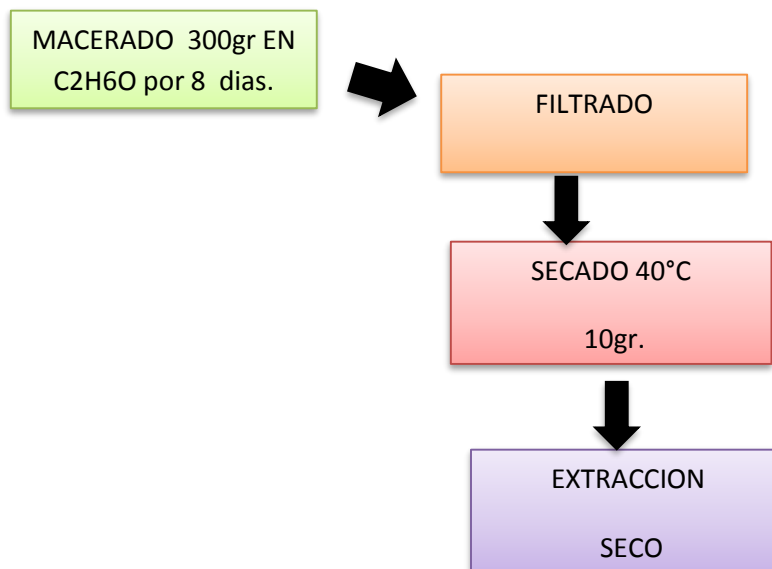


Figura 5. Flujograma preparación del extracto alcohólico de raíz, tallo, hojas, de *Rumex crispus L.* "Cuturumasa"

4. Identificación de metabolitos primarios y secundarios: (Cualitativos).

Reactivos de identificación de metabolitos secundarios:

Flavonoides:

Son sustancias fenólicas de múltiples acciones farmacológicas: antioxidantes antiinflamatorias, etc.

Es el grupo más abundante de metabolitos existentes en plantas. (34)

- **Reacción Shinoda.-** (Positivo, coloración roja).

III gotas de muestra (Llevarse a sequedad + gotas de metanol)

- **Acetato de plomo básico.-** (Positivo, coloración amarillo intenso – anaranjado).

III gotas de muestra llevarlo a sequedad y añadir en el tubo de prueba II gotas de acetato de plomo básico.

Saponinas:

Son compuestos fenólicos de naturaleza esteroideal y triterpenica una de las acciones más clásicas es la expectorante, que deriva de la estimulación de la secreción traqueo bronquial por un reflejo autonómico con origen en la mucosa gástrica. (34)

- **Prueba de espuma.-** (Positivo, si la espuma tiene 2 cm de alto y permanece por un lapso de 15 minutos).

- **Liebermann y Burchard.-** (Positivo, presencia de esteroides: Coloración verde a azul verdoso y glicósidos triterpénicos coloración roja).

III gotas de muestra + X gotas de anhídrido acético + V gotas de H₂SO₄ CC.

Alcaloides:

Estos compuestos aminados son particularmente interesantes por la gran variedad de efectos que presentan. (34)

- **Solución de Mayer.-** (Positivo, precipitado blanco lechoso).

III gotas de muestra, llevar a sequedad y disolver con 0.5 mL de HCl al 1 por ciento, tomar V gotas de esta disolución + III o IV gotas de Mayer.

- **Solución de Wagner.-** (Positivo, coloración marrón rojizo oscuro).

III gotas de muestra, llevar a sequedad y disolver con 0.5 mL de HCl al 1 por ciento, tomar V gotas de esta disolución + II o III gotas de Wagner

Cumarinas:

Tiene importantes propiedades venotónicas, protectoras vasculares y vitamínicas, por lo que se utiliza en trastornos venolinfáticos (hemorroides, edemas) y en caso de fragilidad capilar. (34)

- **Hidróxido de sodio al 10 por ciento.-** (Positivo, coloración amarillo intenso).

En un tubo añadir III gotas de muestra + II gotas de reactivo.

Taninos:

Son sustancias con propiedades astringentes y avaladas por la experimentación debido a su capacidad para formar complejos con varias sustancias, pero además su actividad antioxidante, basada en la captura de radicales libres y por sus propiedades restauradoras. (34)

Compuestos fenólicos:

Las tres acciones más importantes son: La actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante.

- Solución reactivo de Tricloruro férrico.- (Positivo, coloración verde Azul).
Taninos hidrolizables: Azul negruzco. Taninos condensados: Verde. III gotas de muestra + II gotas de Cl_3F .

Quinonas:

Son metabolitos secundarios que constan de un núcleo antracénico y presentan propiedades laxantes y hepatoprotectoras. Se obtienen por biosíntesis del ácido shikímico y ácido mevalónico.

- III gotas de muestra + calor a sequedad + 0.5 o 1 mL de tolueno o benceno + 1 mL de NaOH al 5 por ciento (Aparición de color rojo en fase acuosa da positivo).

Aminoácidos libres y grupos amino:

Ninhidrina (0.1% en etanol) X gotas de MP + III gotas de ninhidrina + calentar en B.M 10 min. La coloración violácea es una reacción positiva.

Saponinas:

Permitió conocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esférico como triterpénico. De modo que si la alícuota se encontró alcohol. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del tubo.

- **Reactivo de gelatina.-** (Positivo, pp blanco).

III gotas de muestra + III gotas de gelatina

Compuestos fenólicos:

Las tres acciones más importantes son: La actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante. (34)

- **Solución reactivo de Tricloruro férrico.-** (Positivo, coloración verde Azul).

Taninos hidrolizables: Azul negruzco.

Taninos condensados: Verde.

III gotas de muestra + II gotas de Cl_3Fe

Antraquinona:

Son metabolitos secundarios que constan de un núcleo antracénico y presentan propiedades laxantes y hepatoprotectoras. Se obtienen por biosíntesis del ácido shikímico y ácido mevalónico. (34)

III gotas de muestra + calor a sequedad + 0.5 o 1 mL de tolueno o benceno + 1 mL de NaOH al 5 por ciento (Aparición de color rojo en fase acuosa da positivo).

5. Equipos y materiales.

Materia Prima

La presente investigación utilizada como materia prima; raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. (cuturrumasa) y huevos fértiles de (*Gallus gallus domesticus*). Y así mismo las muestras fueron sometidas a las operaciones de recolección, identificación y limpieza.

Equipos

- Incubadora artesanal
- Balanza analítica
- Agitador magnético
- Estufa
- Ovoscopio

Material

- Tubo de muestra
- Pipetas de 10ml
- Vaso precipitado de 100ml
- Gradilla
- pinzas
- Goteros
- Viales
- Propipeta
- Frascos 100ml
- Pinza

- Baguetas
- Embudo
- Cuchilla
- Espátula
- Agua destilada

Reactivos

- Agua
- Metanol
- Alcohol
- Butanol
- Cloroformo
- Diclorometano
- Dragendorff
- Shinoda
- Cloruro férrico
- Gelatina
- L. Burchard
- Nihidrina
- Bortranger
- Molish
- Mg
- Ácido sulfúrico
- Lauril sulfato de sodio
- Hidróxido de sodio
- Etanol

Prueba de solubilidad

Tabla 2: Prueba de solubilidad del Extracto etanolico de raíz de *Rumex crispus* L. "Cuturrumasa

Reactivos	Raíz
Diclorometano	0
Butanol	0
Metanol	0
Agua destilada	+
Alcohol	+++

LEYENDA:

Muy Soluble +++
Soluble ++
Poco soluble +
Insoluble 0

Tabla 3: Prueba de solubilidad del Extracto etanólico de tallo de *Rumex crispus L.*"Cuturrumasa

Reactivos	tallo
Diclorometano	0
Butanol	0
Metanol	0
Agua destilada	++
Alcohol	++

Tabla 4: Prueba de solubilidad del Extracto etanólico de hojas de *Rumex crispus L.*"Cuturrumasa

Reactivos	Hoja
Diclorometano	0
Butanol	0
Metanol	0
Agua destilada	++
Alcohol	+++

LEYENDA:	
Muy Soluble	+++
Soluble	++
Poco soluble	+
Insoluble	0

Marcha fitoquímica

Tabla 5: Fitoconstituyentes presentes en el extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus L.* "Cuturrumasa procedente de Jauja – Junín.

METABOLITO	REACTIVOS	REACCIÓN POSITIVA	RESULTADO
CARBOHIDRATOS	Molish	Anillo violeta	-
	Antrona	Coloración verde	-
	Fehling	Coloración rojo ladrillo	++
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde o azul	+
TANINOS	Gelatina	Precipitado denso blanco	++
FLAVONOIDES	Shinoda	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración. Isoflavanonas: Amarillo rojizo. Flavanonoles: Rojo a magenta. Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo	+
LACTONAS	Baljet	Coloraciónrojo oscuro	++
AMINOÁCIDOS	Ninhidrina(0.1% en etanol)	Coloración violácea	--
ALCALOIDES	Dragendorff	Precipitadonaranja	-
	Mayer	Precipitado blanco	+
	Wagner	Precipitado blanco	+
	Hager	Precipitado amarillo-verdoso	-
QUINONAS	Borntrager	Coloraciónroja	++
TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Lieberman-Burchard	Esteroides: verde-azul Triterpenoides: rojo-naranja	-
SAPONINAS	Espuma	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min.	+++
CATEQUINAS	Catequinas	Fluorescencia celeste	+

Leyenda:

Abundante	+++
Regular	++
Poco	+
Ausencia	--

Tabla 6: Fitoconstituyentes presentes en el extracto etanólico del tallo de *Rumex crispus L.* "Cuturrumasa" procedente de Jauja – Junín.

METABOLITO	REACTIVOS	REACCIÓN POSITIVA	RESULTADO
CARBOHIDRATOS	Molish	Anillo violeta	-
	Antrona	Coloración verde	-
	Fehling	Coloración rojo ladrillo	-
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde o azul	+
TANINOS	Gelatina	Precipitado denso blanco	-
FLAVONOIDES	Shinoda	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración. Isoflavanonas: Amarillo rojizo. Flavanoles: Rojo a magenta. Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo	+
LACTONAS Y CUMRINAS	Baljet	Coloraciónrojo oscuro	-
AMINOÁCIDOS LIBRES Y GRUPOS AMINO	Ninhidrina(0.1% en etanol)	Coloración violácea	-
ALCALOIDES	Dragendorff	Precipitadonaranja	-
	Mayer	Precipitado blanco	+
	Wagner	Precipitado blanco	+
	Hager	Precipitado amarillo-verdoso	-
QUINONAS	Borntrager	Coloraciónroja	+
TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Lieberman-Burchard	Esteroides: verde-azul Triterpenoides: rojo-naranja	+
SAPONINAS	Generación de espuma	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min.	++
CATEQUINAS	Catequinas	Fluorescencia celeste	-

Leyenda:

Abundante	+++
Regular	++
Poco	+
Ausencia	-

Tabla 7: Fitoconstituyentes presentes en el extracto etanólico de la hoja de *Rumex crispus L.* "Cuturrumasa" procedente de Jauja – Junín.

METABOLITO	REACTIVOS	REACCIÓN POSITIVA	RESULTADO
CARBOHIDRATOS	Molish	Anillo violeta	-
	Antrona	Coloración verde	-
	Fehling	Coloración rojo ladrillo	-
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde o azul	+++
TANINOS	Gelatina	Precipitado denso blanco	-
FLAVONOIDES	Shinoda	Chalconas, auronas, isoflavanonas: No hay coloración. Isoflavanonas: Amarillo rojizo. Flavanonoles: Rojo a magenta. Flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo	+++
LACTONAS Y CUMRINAS	Baljet	Coloraciónrojo oscuro	-
AMINOÁCIDOS LIBRES Y GRUPOS AMINO	Ninhidrina(0.1% en etanol)	Coloración violácea	+
ALCALOIDES	Dragendorff	Precipitadonaranja	-
	Mayer	Precipitado blanco	-
	Wagner	Precipitado blanco	-
	Hager	Precipitado amarillo-verdoso	-
QUINONAS	Borntrager	Coloraciónroja	+
TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Lieberman-Burchard	Esteroides: verde-azul Triterpenoides: rojo-naranja	+
SAPONINAS	Generación de espuma	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min.	+
CATEQUINAS	Catequinas	Fluorescencia celeste	--

<u>Leyenda:</u>	
Abundante	+++
Regular	++
Poco	+
Ausencia	--

6. Estandarización del método HET CAM

Se utilizaron huevos fértiles de (*Gallus gallus domesticus*) especie resistente a enfermedades, suministrada por la criadera Oshin Osorio en el distrito de Chosica, departamento de Lima. La compra fue con un peso entre 50 y 60 g.

Se vigilaron los días de incubación de los huevos fértiles.

7. Método HET-CAM

Protocolo experimental

INVITOX núm. 96 descrito por Luepke

- La preparación de la membrana carioalantoidea, se relizo el ensayo utilizando huevos fértiles de gallina, incubados durante 9 días (*Gallus gallus domesticus*).

Los huevos fueron colocados en la incubadora, manteniéndolos a una temperatura de $37,5 \pm 0,5$ °C y una humedad relativa de $62,5 \pm 7,5\%$, con la cámara de aire hacia arriba y sin rotar hasta que alcanzaron los 9 días de incubación. Los embriones fueron revisados bajo la luz de la lámpara para determinar su viabilidad y desechar los que presentaron algún defecto, como rasgaduras o aumento de la porosidad; en ese momento se marcara con un lápiz la cámara de aire.

Primero se expone la membrana corioalanatoidea al aire, con unas tijeras planas se recorta la cascara de huevo en forma circular, se elimina con mucho cuidado la primera membrana blanquecina después de humedecerlo con solución salina. Una vez eliminada

esta primera membrana queda expuesta la membrana corioalantoidea que es transparente y con una abundante irrigación sanguínea.

- Exposición de la membrana a los productos.

Se prepararon soluciones de cada uno de los tensio activos al 2% solución salina y se le aplica 0.3ml a la membrana corioalantoidea durante un periodo de 20 segundos. Transcurrido ese tiempo se retiró el exceso de producto lavado con agua destilada y se realizó la observación de la membrana, para valorar la posible aparición de los siguientes fenómenos: hemorragia, vasoconstricción y coagulación. Se anotó el tiempo de aparición en segundos durante un tiempo máximo de observación de 5 min.

Los reactivos empleados fueron NaCl al 0,9% para el lavado de la membrana, así como NaOH a 0,1 N y SDS al 1% como controles positivos.

Se utilizó material quirúrgico oftálmico, fundamentalmente tijeras y pinzas, lámpara fluorescente para observación de las reacciones, lámpara para el examen de los embriones, cronómetro, tubos de ensayos, beaker, frascos de tapas esmeriladas, pipetas de cristal, pipetas Pasteur, bandejas esmaltadas y frascos lavadores.

- Se procedió a añadir las soluciones estándar de irritación (sustancias de referencia); se observó las reacciones de hemorragia, lisis (desintegración de los vasos) y coagulación (desnaturalización de las proteínas intra y extravasculares) por un tiempo de 5 min y se registró el tiempo en segundos.

- Cálculo del índice de irritación ocular. Cada uno de los productos se ensayo en tres huevos fértiles y se realizó la medida aritmética de los tiempos de aparición de los fenómenos nombrados anteriormente. El índice de irritación ocular se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$I.I. = \frac{(301-h) \times 5}{300} + \frac{(301-v) \times 7}{300} + \frac{(301-c) \times 9}{300}$$

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

Dónde:

H = Hemorragia

L = Lisis de los vasos

C = Coagulación

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

Se determinó el I.I. para 2 huevos con el sodio dodecil sulfato (SDS) al 1% y 2 huevos con NaOH 0,1 N.

Estas dos fueron las sustancias de referencia que constituyen los controles positivos que recoge el protocolo y que se utilizaron para el montaje de la técnica.

Para evaluar el efecto irritante de la muestra problema se prepararon diluciones al 5, 2, 1 y 0.5% de concentración, se colocaron cada uno por triplicado (tres huevos) sobre la MCA directamente cubriendo no menos de la mitad de su superficie durante 5 min; después de este tiempo se

lavó cuidadosamente con NaCl al 0,9% para eliminar la misma de la superficie de la membrana.

Clasificación:

Se evaluó la severidad de las tres reacciones posibles (lisis, hemorragia y coagulación) a los 5 min de aplicadas las sustancias de ensayo, clasificándose de acuerdo con la siguiente escala:

Tabla 8: Clasificación para determinar que la muestra en estudio es irritante según su rango.

Rango HET CAM	Categoría irritante
0,0 – 0,9	No irritante
1,0 – 4,9	irritante leve
5,0 – 8,9	irritante moderado
9,0 – 21,0	irritante severo

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

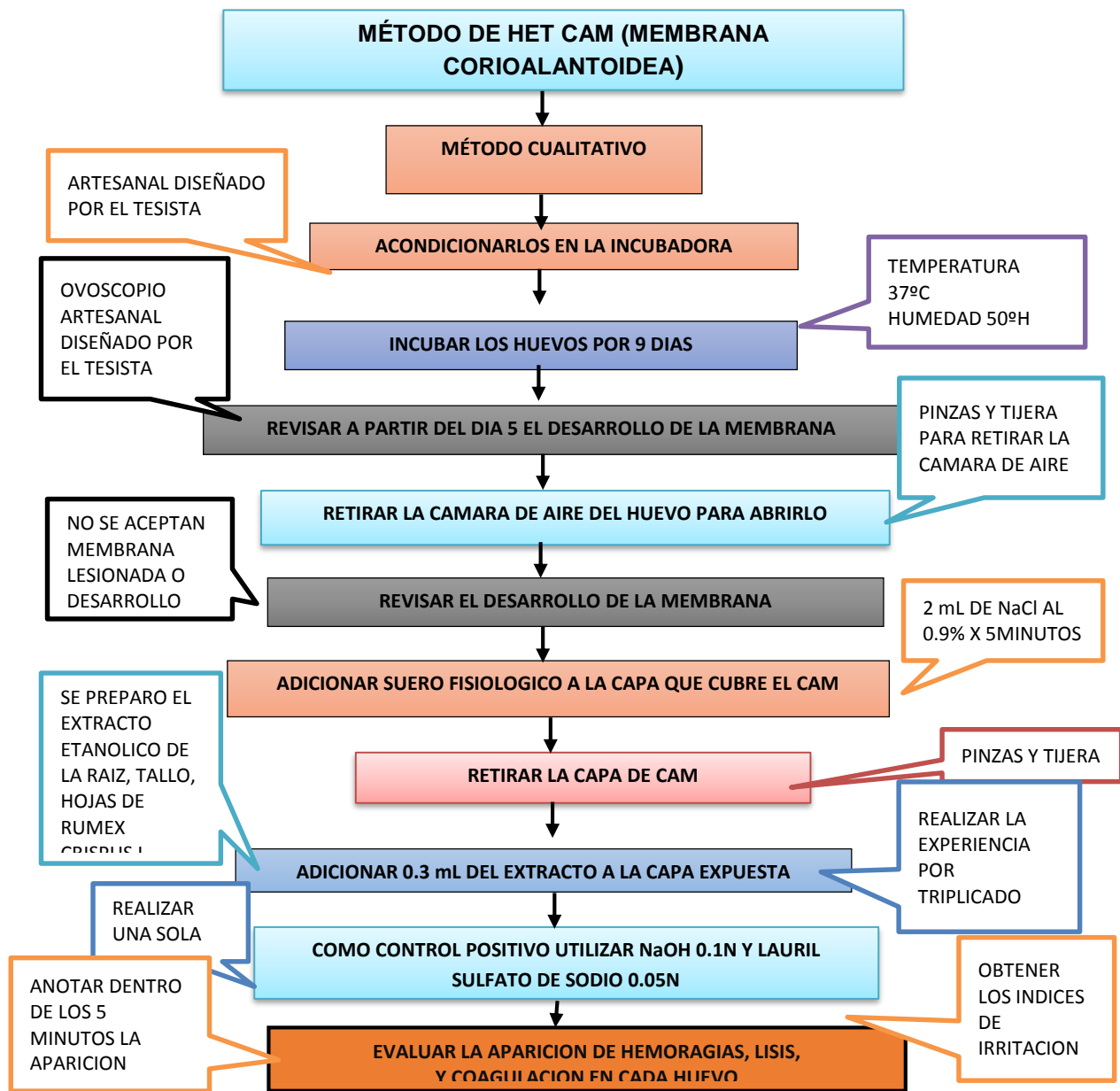


Figura. 6. Flujograma del estudio con el método in vitro basado en el Método Het –Cam.

Método HET-CAM

Tabla 9: Resultados de los controles del método Het – Cam

CONTROL	TIPO DE CONTROL	TIEMPO	REACCION	(SEGUNDOS)	INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
SUERO FISIOLÓGICO	BLANCO	301	301	301	0,00	NO IRRITANTE
LAURIL SULFATO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 1	301	120	150	8.74	IRRITANTE MODERADO
HIDROXIDO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 2	170	110	150	11.15	IRRITANTE SEVERO
ETANOL	SOLVENTE USADO	200	250	280	3.5	IRRITANTE LEVE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

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

Tabla 10: Resultados del método Het – Cam del Extracto etanólico de la Raíz de *Rumex Crispus* L. “Cuturumasa”.

Extracto alcohólico	Concentración	TIEMPO REACCIÓN (SEGUNDOS)			INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
Raíz	5%	170	150	180	9,32	IRRITANTE SEVERO
Raíz	2%	180	160	190	8,63	IRRITANTE MODERADO
Raíz	1%	200	220	250	2,63	IRRITANTE LEVE
Raíz	0,5%	210	290	280	2,39	IRRITANTE LEVE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

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

Tabla 11: Resultados del método Het – Cam del Extracto alcohólico de la Tallo de Rumex Crispus L. “Cuturumasa”.

Extracto alcohólico	Concentración	TIEMPO	REACCION	(SEGUNDOS)	INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACION		
Tallo	5%	150	170	160	9,33	IRRITANTE SEVERO
Tallo	2%	180	180	170	8.74	IRRITANTE MODERADO
Tallo	1%	190	200	180	7,82	IRRITANTE MODERADO
Tallo	0,5%	280	270	210	3,79	IRRITANTE LEVE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

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

Tabla 12: Resultados del método Het – Cam del Extracto alcohólico de la Hoja de *Rumex Crispus* L. “Cuturrumasa”

Extracto alcohólico	Concentración	TIEMPO	REACCIO N	(SEGUNDOS)	INDICE DE IRRITACIO N	CLASIFICACION
		HEMORRAGI A	LISIS	COAGULACION		
Hoja	5%	180	190	220	7,03	IRRITANTE MODERADO
Hoja	2%	250	260	260	3,03	IRRITANTE LEVE
Hoja	1%	290	270	280	1,53	IRRITANTE LEVE
Hoja	0,5%	310	300	290	0,35	NO IRRITANTE

LEYENDA	
RANGO HET-CAM	IRRITACION CATEGORIA
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

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

4.2. Discusión de Resultados

Los extractos de las raíz, tallo y hojas *Rumex crispus* L. "Cuturumasa" presenta una muy alta solubilidad en etanol **(Tabla 2, 3,4)**

Los metabolitos encontrados fueron: Raíz: (Carbohidratos, Compuestos fenólicos, Taninos, Flavonoides, Aminoácidos, Quinonas) Tallo: (Carbohidratos, Compuestos fenólicos, Taninos, Flavonoides, Aminoácidos, Quinonas.) Hojas: (Carbohidratos, Compuestos fenólicos, Taninos, Flavonoides, Aminoácidos, Quinonas, Alcaloides) **(Tabla 5,6,7)**

Los controles realizados sobre la membrana corioalantoidea mostraron lesiones al aplicarse" Lauril sulfato de sodio - SDS "(Irritante moderado), NaOH (irritante severo) y etanol (irritante leve), no fue así en el cloruro de sodio **(Tabla 9)**

Los resultados del extracto etanólico como **irritante severo** en el rango de 9.0 – 21.0 en la prueba de Het – cam tenemos; a la raíz en concentración de 5% con un índice de irritación de 9,32 y también en el tallo en una concentración de 5% con un índice de irritación de 9,33.

Entonces concluyo; que la raíz y el tallo en una concentración de 5% de extracto etanólico de *Rumex crispus* L. se mantiene en el mismo rango como irritante severo. **(Tabla 10, 11,12)**

Los resultados del extracto etanólico como **irritante moderado** en el rango de 5.0 – 8.9 en la prueba de Het – cam tenemos a la raíz en concentración de 2% con un índice de irritación de 8,63; también en el tallo en una concentración de 2% con un índice de irritación de 8,74 y 1% con un índice de irritación de 7,82; de igual manera en la hoja en concentración de 5% con un índice de irritación 7,03.

Entonces concluyo; que la raíz, tallo y hojas en concentraciones de 1%,2% y 5% de extracto etanólico de *Rumex crispus* L. se mantienen en el mismo rango como irritante moderado. **(Tabla 10, 11,12)**

Los resultados del extracto etanólico como **irritante leve** en el rango de 1.0 – 4.9 en la prueba de Het – cam tenemos a la raíz en concentración de 0.5%

con un índice de irritación de 9,39, y al 1% con índice de irritación al 2,63 y también en el tallo en una concentración de 0,5% con un índice de irritación de 3,79 y también en la hoja al 1% con un índice de irritación 1,53% y 2% con un índice de irritación de 3,03.

Entonces concluyo; que la raíz, tallo y hojas en concentraciones de 0,5%,1% y 2% de extracto etanólico de *Rumex crispus* L. se mantienen en el mismo rango como irritante leve. **(Tabla 10, 11,12)**

Los resultados del extracto etanólico como **no irritante** en el rango de 0 – 0,9 en la prueba de Het – Cam tenemos a las hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturumasa” con una concentración 0.5% con un índice de 0,35 clasificándose como no irritante ocular por los metabolitos secundarios presentes, que se encuentran en un grupo importante con propiedades antiinflamatorias; (compuestos fenólicos y flavonoides), ya que estos compuestos ejercen su acción farmacológica interfiriendo la producción de diferentes mediadores químicos del proceso inflamatorio.

Los resultados comprueban las hipótesis propuestas de esta investigación.

Se confirma que por el método de Het - Cam del extracto etanólico de la raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “cuturumasa” posee actividad irritante ocular los metabolitos de dicha planta (ensayo in vitro).

Los resultados del Extracto etanólico de la hoja de *Rumex Crispus* L. “Cuturumasa”, presentó un efecto irritante, resultado muy similar al de Rodríguez Andrés, en Colombia 2011 quienes realizaron la evaluación de la actividad anti-irritante del extracto etanólico de raíz de *Cnidioscolus urens* L. concluyendo que el extracto etanólico de raíz de *c. urens* posee efecto anti irritante, anti-hemorrágica y anticoagulante.

También los resultados se pueden comparar con los de Churampi López en 2015, quienes Evaluaron la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” concluyendo actividad antiinflamatoria y seguridad como activo biológico.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. La raíz, tallo y hojas de *Rumex crispus* L. “cuturrumasa” procedente del Distrito de Molinos, Provincia de Jauja, Departamento de Junín a 3.340 m.s.n.m. presentan los siguientes fitoconstituyentes: flavonoides, saponinas, quinonas, taninos y alcaloides.

2. El extracto etanólico de la raíz y tallo de *Rumex crispus* L. “Cuturrumasa” a concentraciones de 0,5%,1%,2% y 5% poseen actividad irritante ocular in vitro mediante el modelo experimental del método Het – Cam y el extracto etanólico de hojas de *Rumex crispus* L. “Cuturrumasa” es no irritante ocular en una concentración de 0.5% demostrándose su futura utilidad en investigación fitoquímica y farmacológica.

5.2 Recomendaciones

1. Proponer la validación del método para que los resultados puedan reproducirse y tener un mejor sustento de las pruebas.
2. Por los resultados obtenidos de la planta de *Rumex crispus* L. en especial del extracto etanólico de la hoja en una concentración al 0.5% obtenido por el método del Het – Cam no provoca irritación ocular y debe ser considerada para posteriores estudios en la elaboración de productos oftálmicos y dermatológicos.
3. Se recomienda continuar los estudios de irritabilidad con otras especies vegetales de potencial terapéutico para proponer alternativas de curación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wallace H. Principales métodos de toxicología. 2 ed. New York: Raven Press; 1994.
2. Balls M. Bothan P. Spielmann H. International calibration study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. Toxicol In Vitro The EC (European Comision) 1995.
3. Bruner LH. Shaddock JA. Essex-Sorlie D. Alternative methods for assessing the effects of chemical on the eye. Dermal and Ocular Toxicology. Fundamental and Methods, New York: CRC Press; 1991.
4. Propiedades de los frutos de invierno [<http://www.botanical-online.com/>]. España: BOTANICAL-ON LINE SL.; 1999 [actualizado 19 Dic 2014; citado 19 Dic 2014].
5. Vaquero P. Gonzalez P. .Metodos alternativos a la experimentación animal. Anal Acad Med y Cir Vall 1990.
6. Rusell W. Burch R. the Principles of humane Experimental Techique. London; 1959.
7. Churampi L., Montes M. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de Passiflora mollissima (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” y su uso como activo biológico en industria cosmética (tesis para optar el grado académico de Químico Farmacéutico). UNMSM, Lima, Perú; 2015.

8. Fernández F., González B., Gil M., Blanco M., M. Lamas D., Francisco J. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM; 2014.
9. Inocente M. Toscano G, Castañeda C. Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método Het Cam. Horizonte Medico 2013.
10. Mendoza M., Dary L. and Saavegra A., Stephanie. Composición química y capacidad anti- irritante de extractos de cuerpo entero de Ulomoides dermestoides (coleoptera, tenebrionade). Vitae [online]. 2013.
11. González M. Orestes C. Molina. Iglesias .Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas Serafín Ruiz de Zarate Ruiz.2015.
12. González M. Castillo. Molina. Nieves Iglesias Unidad de Toxicología Experimental (UTEX) 2014.
13. Taype E. “Estandarización y validación del método de Het- Cam para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de los cinco frutos nativos del Perú” UNMSM.2015.
14. Flores, Rosario, presentaron el estudio titulado; “Estudio químico de Rumex crispus”.UNMSM.1986.
15. Moncayo S. “Determinación preliminar de fitoconstituyentes presentes en las hojas de Rumex crispus l. (lengua de vaca) procedente del distrito de Otuzco - La Libertad”.2012.

16. Moncayo, santos, "Determinación de fitoconstituyentes del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. (lengua de vaca) y su efecto antibacteriano in vitro frente a *escherichia coli* y *staphylococcus aureus*". La Libertad. 2014.
17. Vásquez R. , Martínez M. , Mendoza M. Determinación de la actividad anti-irritante del extracto etanolico de raíz de *Cnidioscolus urens* L. 2011.
18. Batista, "Métodos alternativos para la Evaluación Inmunotoxicológica de Adyuvantes Vacúnales". 2013.
19. Murillo J. Pérez M., Luis U. Revista Cubana de Farmacia Publicador: Revista Cubana de Farmacia ; 2011.
20. Corrado, "Ensayos Toxicológicos Utilizados en el Control de Calidad de Productos que han sido Cuestionados por Grupos Defensores del Bienestar de animales por llevar al Sacrificio y Sufrimiento Injustificado de un número Extraordinario de animales". 2007
21. El peruano. Normas Legales ley-de-proteccion-y-bienestar-animal-ley-n-30407-1331474. Peru (revisado 10 junio 2017)
22. Lock de ugaz O. Investigacion Fitoquimica: Metodos en el estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial de la Universidad Catolica del Peru. Lima. 1994.
23. Castillo C, Carlos "familia polygonaceae" flora bajo y las regiones adyacentes, facultad de estudios superiores Zaragoza. Mexico. 2008

24. Muller, C.H., & Ch. Chan-Hung. Ph Phytotoxin:an ecological phase of phytochemistry, p. Harborne (ed.). Phytochemical Ecology. 1972.
25. Murillo G. García. Pascual J. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina para la evaluación de la irritabilidad ocular. Rev Toxicol; 2003
26. Spielmann H. HET-CAM Test. The ERGATT/FAME. Databank of in vitro techniques. INVITTOX; 1992
27. Knight DJ, Breheny D. Alternatives to animal testing in the safety evaluation of products. ATLA 2002
28. Prisen M. The chicken enucleated practical (pre9 screen for the assessment of eye irritation/ corrosión potencial of test materials.food and chemical Toxicology 1996.
29. Lordo RA, Feder PI, Gettings SD. Comparing and evaluating alternative (in vitro) tests on their ability to predict the Draize maximum average score. Toxicology in Vitro .1999.
30. Zuang V. The neutral red rease assay: a review. ATLA 2011.
31. International Organization for Standardization. Draf international estándar .Bion Eval Med Devices. 1992.
32. Woods, F.V. Biological antagonism due to phytotoxic root exudates.1960.

33. Perez G. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. Rev Cubana Invest Biomed.2003
34. Metodología de la Investigación 2017. [Internet] Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos98/de-metodologia-de-lainvestigacion/de-metodologia-de-la-investigacion.shtml>. (consultado 8 mayo 2017).
35. Ávila H. Introducción a la Metodología de la Investigación. Ediciones Eumed.Net. Cuauhtémoc, Chihuahua. México. 2006.
36. Ávila H. Introducción a la Metodología de la Investigación. Ediciones Eumed.Net. Cuauhtémoc, Chihuahua. México;2006.
37. Eyenari, M. Germination inhibitors. Bot; 1949.
38. Animals in Product Testing, National Anti-Vivisection Society, consultado el 29 de junio de 2017

ANEXO

ANEXO 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: ACTIVIDAD IRRITANTE OCULAR IN VITRO POR EL METODO HET – CAM DEL EXTRACTO ETANOLICO DE RAIZ,TALLO,HOJAS DE RUMEX CRISPUS L. “CUTURRUMASA”								
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADORES	METODOLOGIA
¿Presentara actividad irritante ocular in vitro por el método Het – Cam el extracto etanólico de raíz, tallo, hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa”?	Determinar la actividad irritante ocular in vitro por el método Het – Cam y la composición química del extracto etanólico raíz,tallo,hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa	Presenta actividad irritante ocular in vitro el extracto etanólico de raíz, tallo,hojas de Rumex crispus L.” Cuturrumasa” por el metod Het – Cam.	Extracto etanolico de raíz,tallo,hojas de Rumex Crispus L.” Cuturrumasa”	Identificación organoléptica	Extracto etanolico	Ficha de cotejo de parámetros organolépticos	Aspecto Olor Color sabor	<p>Diseño Experimental in vivo</p> <p>Tipo: Básica</p> <p>Nivel: Correlacional Explicativa</p> <p>Población y muestra: 10 ensayos en huevos de gallina fértil</p> <p>Instrumentos de recolección de datos: Ficha de recolección de datos</p> <p>Instrumentos Reactivos Estufas Rotavapor Ovoscopio incubadora</p> <p>Técnica: Metodo Het - Cam</p> <p>Procesamiento y análisis de datos: SPSS y ANOVA simple (una vía) y una prueba “t” de Student para comparaciones entre tratamiento y control</p>
				Identificación Fitoquímica	Flavonoides Fenoles Taninos Saponinas Leucoantioc. Lactonicos Triterpenos Quinonas Alcaloides	Rx de Shinoda Rx de FeCl3 Rx de Proteinas Met. de Espuma Rx Rosenheim Rx de Legal Rx de Liebermann Rx de Borntrenger Rx de Dragendorff – Mayer	Rojiza Azul, Verde Blanco Espuma Rojo Verde, Azul Rojo en fase H2O Anaranjado- Blanco- Crema	
PROBLEMA ESPECIFICO	OBJETIVO ESPECIFICO	HIPOTESIS ESPECIFICA	VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADORES	
¿Cuál será la composición de extracto etanólico de raíz, tallo, hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa”?	Obtener el extracto etanólico de raíz,tallo,hojas, de Rumex crispus L.”Cuturrumasa” y determinar sus componentes fitoquímicos.	El extracto etanólico de la raíz, tallo, hojas de Rumex crispus L. “ Cuturrumasa” tiene metabolitos secundarios que se pueden definir mediante su perfil fitoquímico.	Actividad irritante ocular in vitro método Het – Cam.	Identificación del macroscópica	Lisis hemorragia de coagulación	Ficha de irritación	Lesión o daño a la membrana corioalantoidea	
¿Tendrán actividad irritante los metabolitos de raíz,tallo,hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa” mediante el método Het – Cam?	Determinar el efecto irritante de la raíz,tallo,hojas de Rumex crispus L. “cuturrumasa” mediante el método Het – Cam.	Tiene actividad irritante ocular los metabolitos de raíz, tallo,hojas de Rumex crispus L. “ Cuturrumasa” evaluado mediante el método Het – Cam.						

ANEXO 2. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: ACTIVIDAD IRRITANTE OCULAR IN VITRO POR EL METODO HET – CAM DEL EXTRACTO ETANOLICO DE RAIZ,TALLO,HOJAS DE RUMEX CRISPUS L. “CUTURRUMASA”

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLE INDEPENDIENTE
¿Presentara actividad irritante ocular in vitro por el método Het – Cam el extracto etanólico de raíz, tallo, hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa”?	Determinar la actividad irritante ocular in vitro por el método Het – Cam y la composición química del extracto etanólico raíz,tallo,hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa	Presenta actividad irritante ocular in vitro el extracto etanólico de raíz, tallo,hojas de Rumex crispus L.” Cuturrumasa” por el metod Het – Cam.	Extracto etanolico de raíz,tallo,hojas de Rumex Crispus L.” Cuturrumasa”
PROBLEMA ESPECIFICO	OBJETIVO ESPECIFICO	HIPOTESIS ESPECIFICA	VARIABLE DEPENDIENTE
¿Cuál será la composición de extracto etanólico de raíz, tallo, hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa”?	Obtener el extracto etanólico de raíz,tallo,hojas, de Rumex crispus L.”Cuturrumasa” y determinar sus componentes fitoquimicos.	El extracto etanólico de la raíz, tallo, hojas de Rumex crispus L. “ Cuturrumasa” tiene metabolitos secundarios que se pueden definir mediante su perfil fitoquimico.	Actividad irritante ocular in vitro método Het – Cam.
¿Tendrán actividad irritante los metabolitos de raíz,tallo,hojas de Rumex crispus L. “Cuturrumasa” mediante el método Het – Cam?	Determinar el efecto irritante de la raíz,tallo,hojas de Rumex crispus L. “cuturrumasa” mediante el método Het – Cam.	Tiene actividad irritante ocular los metabolitos de raíz, tallo,hojas de Rumex crispus L. “ Cuturrumasa” evaluado mediante el método Het – Cam	

ANEXO 3. OPERACIONALIDAD DE VARIABLES

TITULO: ACTIVIDAD IRRITANTE OCULAR IN VITRO POR EL METODO HET – CAM DEL EXTRACTO ETANOLICO DE RAIZ,TALLO,HOJAS DE <i>RUMEX CRISPUS L.</i> “CUTURRUMASA”				
DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADORES	METODOLOGIA
Identificación organoléptica	Extracto etanolico	Ficha de cotejo de parámetros organolépticos	Aspecto Olor Color sabor	<p>Diseño Experimental in vitro</p> <p>Tipo: Básica</p> <p>Nivel: Correlacional Explicativa</p> <p>Población y muestra: 10 ensayos en huevos de gallina fertil</p> <p>Instrumentos de recolección de datos: Ficha de recolección de datos</p> <p>Instrumentos Reactivos Estufas Rotavapor Ovoscopio incubadora</p> <p>Técnica: Metodo Het - Cam</p> <p>Procesamiento y análisis de datos: SPSS y ANOVA simple (una via) y una prueba “t” de Student para comparaciones entre tratamiento y control</p>
Identificación Fitoquímica	Flavonoides Fenoles Taninos Saponinas Leucoantioc. Lactonicos Triterpenos Quinonas Alcaloides	Rx de Shinoda Rx de FeCl3 Rx de Proteinas Met. de Espuma Rx Rosenheim Rx de Legal Rx de Liebermann Rx de Borntranger Rx de Dragendorff – Mayer	Rojiza Azul, Verde Blanco Espuma Rojo Verde, Azul Rojo en fase H2O Anaranjado- Blanco- Crema	
DIMENSIONES	ITEM	INSTRUMENTO	INDICADORES	
Identificación del macroscópica	Lisis hemorragia de coagulación	Ficha de irritación	Lesión o daño a la membrana corioalantoidea	

ANEXO 4. CONSTANCIA BOTANICA DE LA ESPECIE *Rumex crispus L*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

CONSTANCIA N^o. 253-USM-2012

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Raíz, tallo, hoja y flor), recibida de **Mercedes del Pilar RIVERA HUAYTALLA**, de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: ***Rumex crispus L.***; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: CARYOPHYLLIDAE

ORDEN: POLYGNONALES

FAMILIA: POLYGONACEAE

GENERO: *Rumex*

ESPECIE: *Rumex crispus L.*

Nombre vulgar: "Cuturrumasa".
Determinado por: Severo Baldeón.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 20 de septiembre de 2012



Haydee Montoya Terreros
Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



FIGURA 7. *Rumex crispus* L. "Cuturumasa"



FIGURA 8. Recolección de Raíz Tallo y Hojas frescas de la *Rumex crispus* L. “Cuturumasa”



**FIGURA 9. Raíz Tallo y Hojas desecadas del *Rumex crispus* L.
"Cuturumasa"**

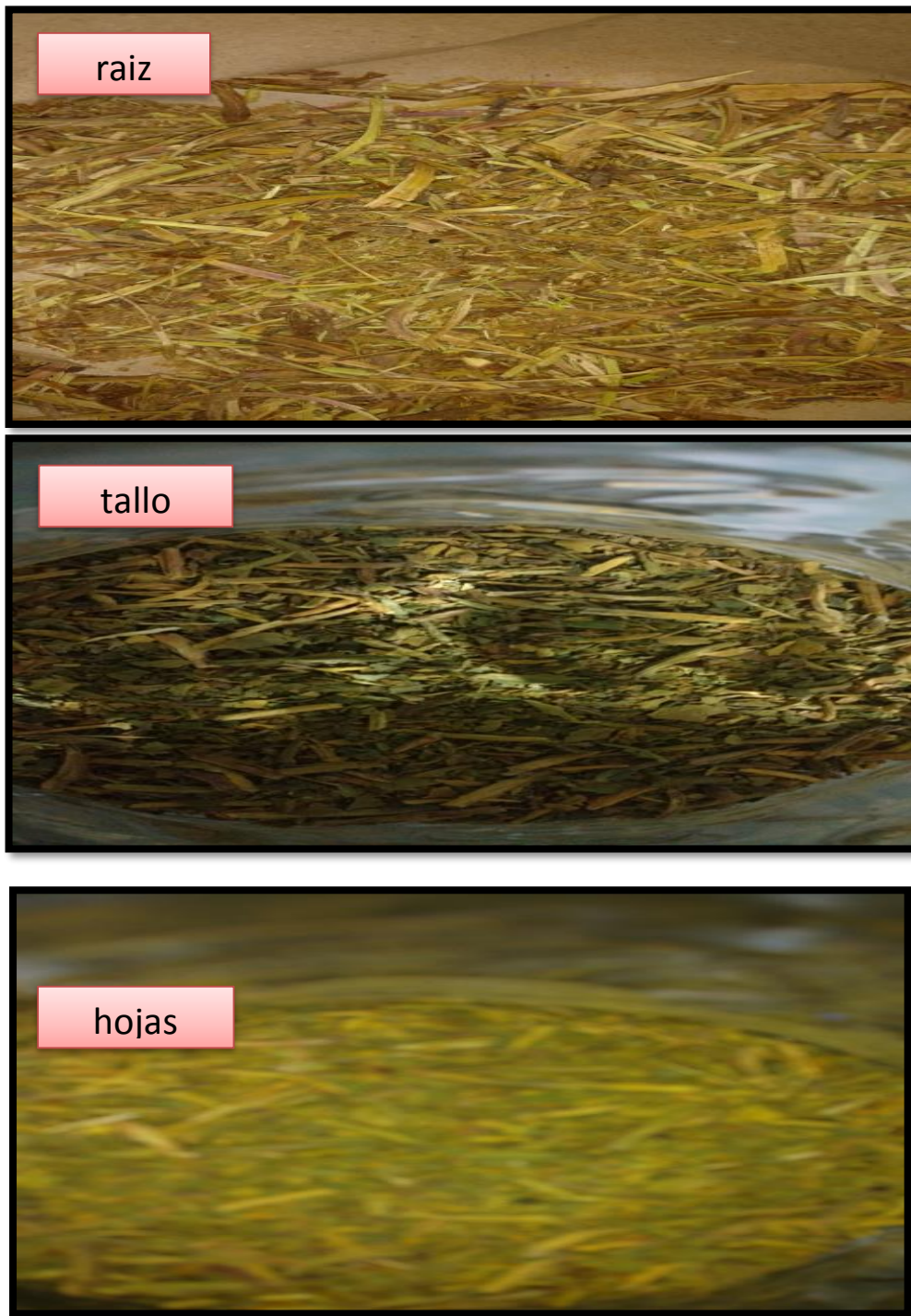


FIGURA 10 Raíz Tallo y Hojas trituration del *Rumex crispus L.*
"Cuturrumasa"



FIGURA 11. Raíz Tallo y Hojas maceración de *Rumex crispus* L.



FIGURA 12. Raíz Tallo y Hojas extracto de *Rumex crispus L*

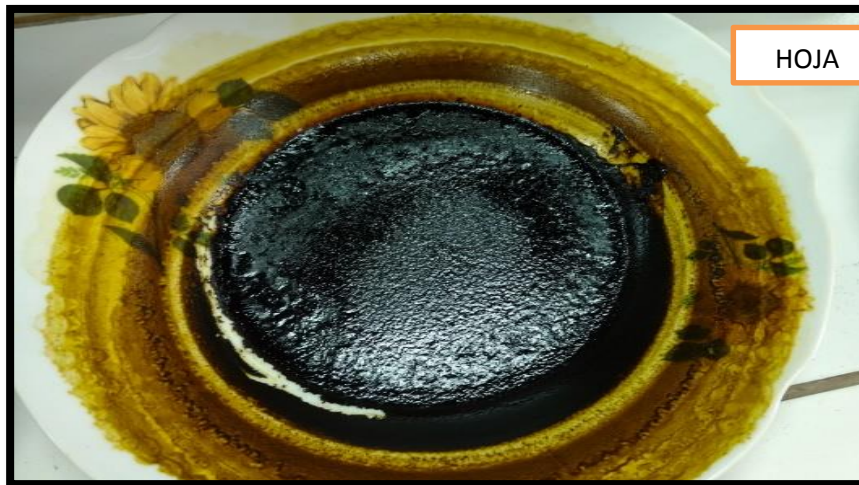
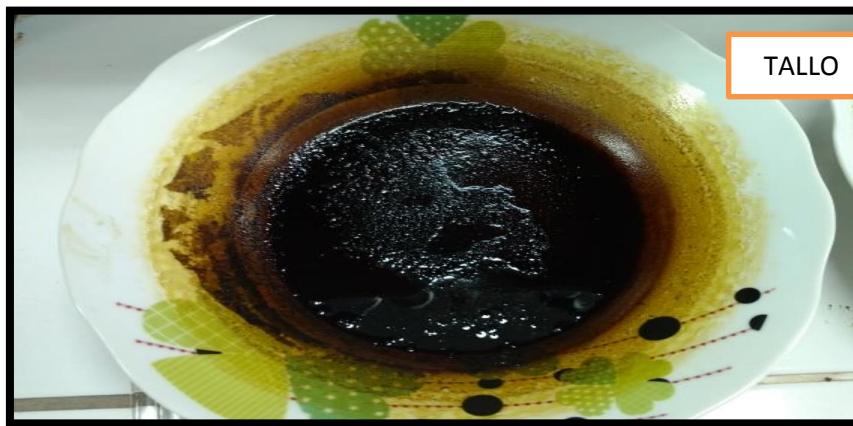


FIGURA 13. Raíz Tallo y Hojas extracto seco de *Rumex crispus L*

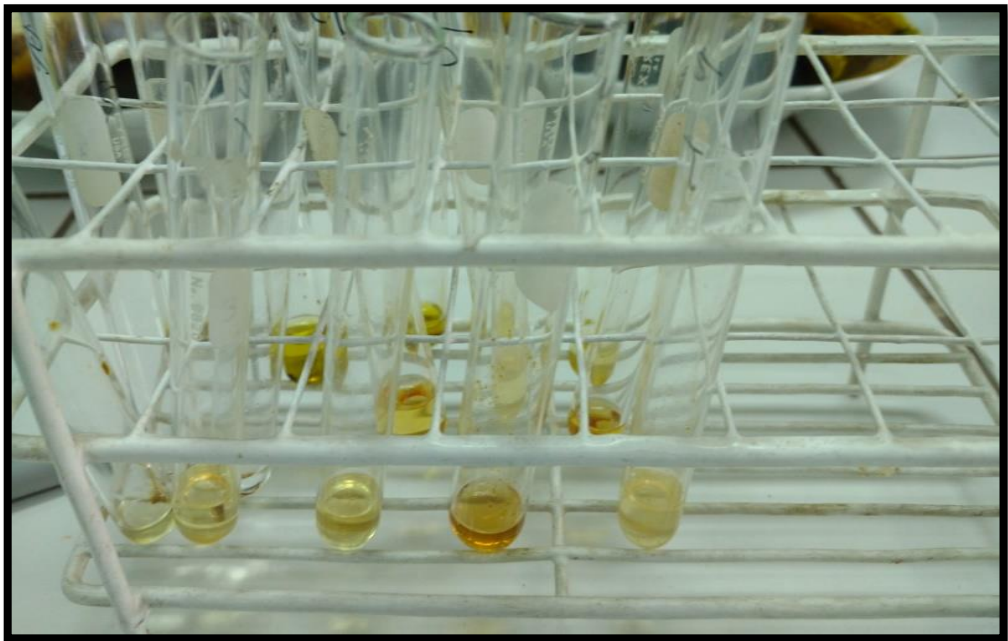


FIGURA 14 prueba de solubilidad de la Hojas de *Rumex crispus L*

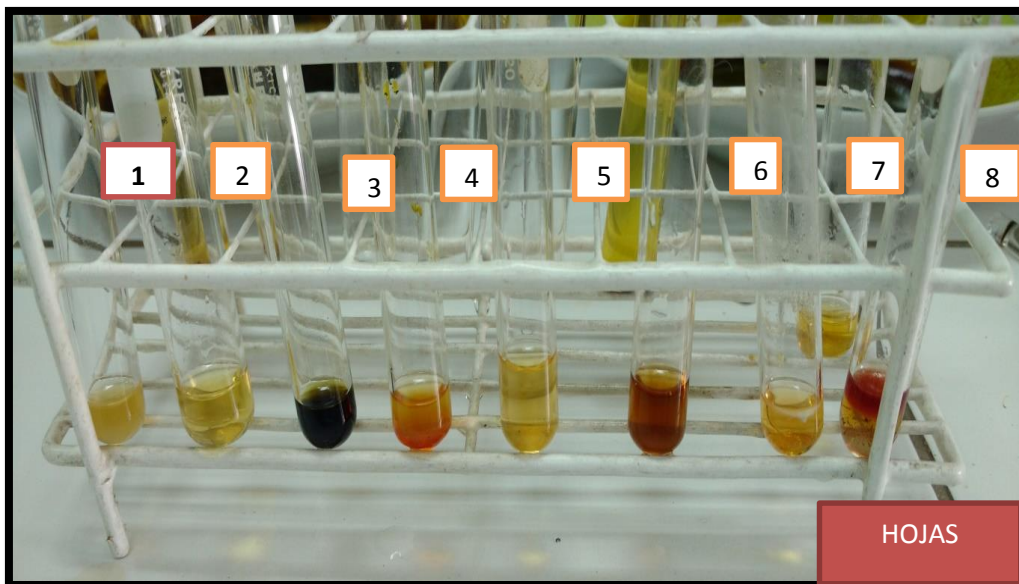


FIGURA 15 Reacciones químicas del extracto etanólico de la hoja de *Rumex crispus* L “Cuturrumasa”

1. Catequinas (+); 2. Resinas (-); 3. Fehling (+); 4. Baljet (+); 5. Lieberman-Burchard (-); 6. Espuma (+); 7. cloruro férrico (+); 8. Nihidrina (-)



FIGURA 16 Laboratorio de la Facultad de Farmacia Bioquímico de UNMSM



FIGURA17 Granja de Gallinas y Gallos en el galpón del Distrito de Chosica



FIGURA18 Huevos fértiles para el Het - Cam

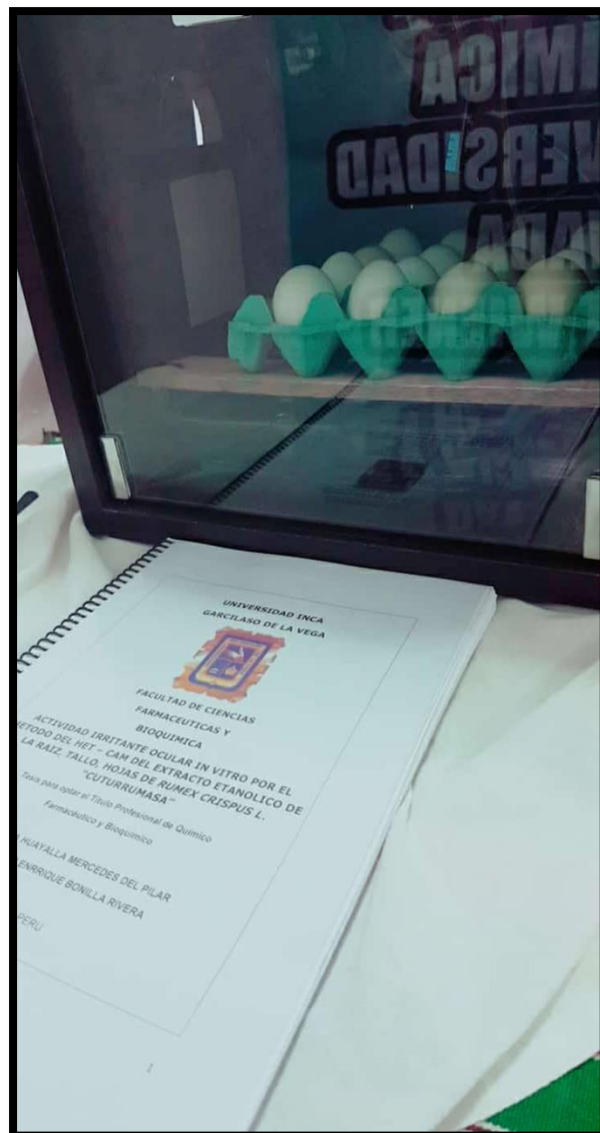
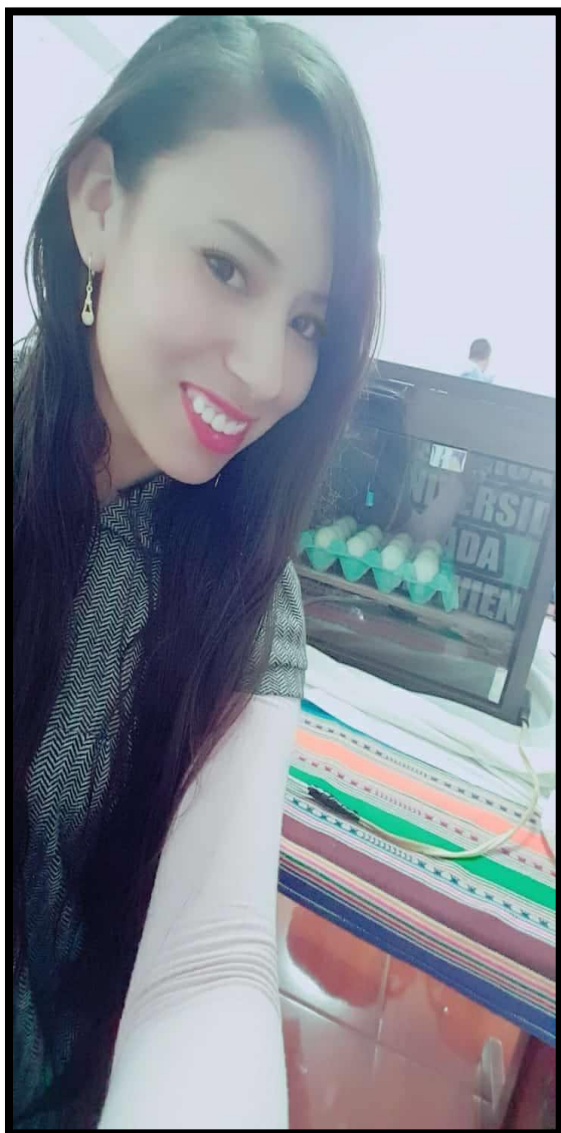


FIGURA19 Elaboración de la incubadora

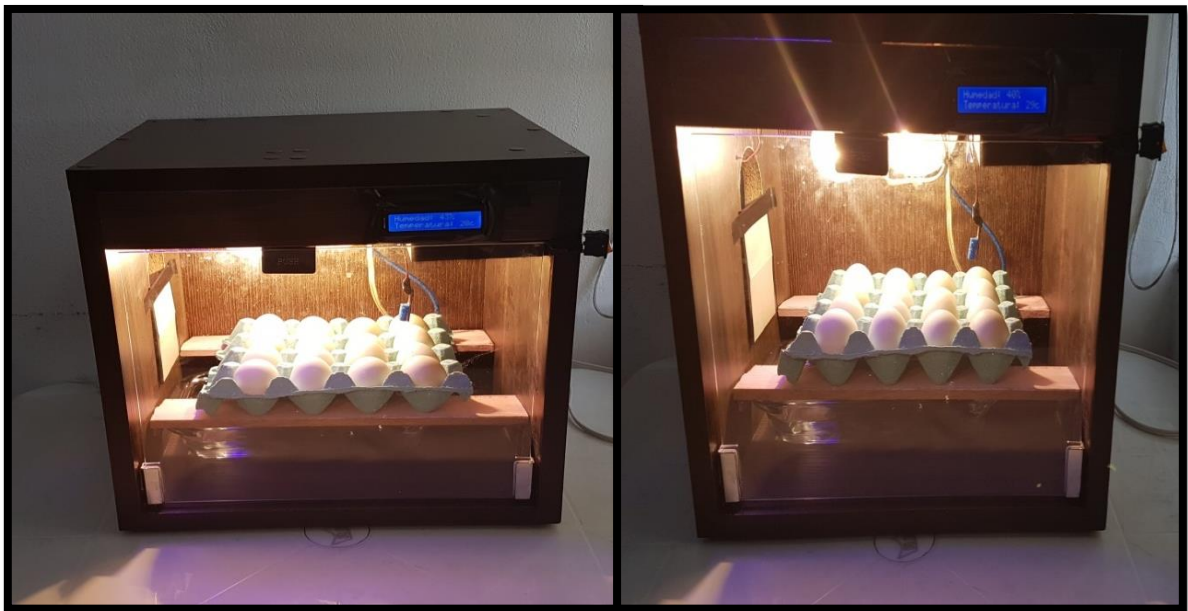
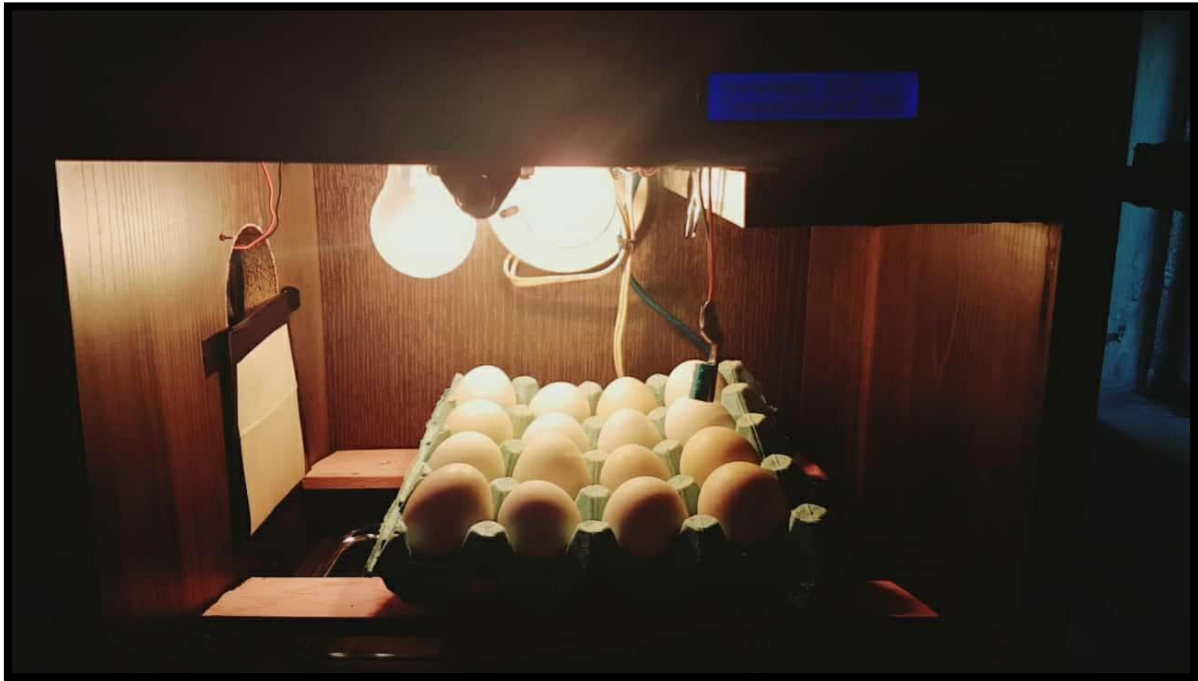


FIGURA 20 Incubadora artesanal para el Het - Cam



FIGURA 21 Ovoscopio artesanal para el Het - Cam



FIGURA 22 Preparación de las diluciones para el Het - Cam

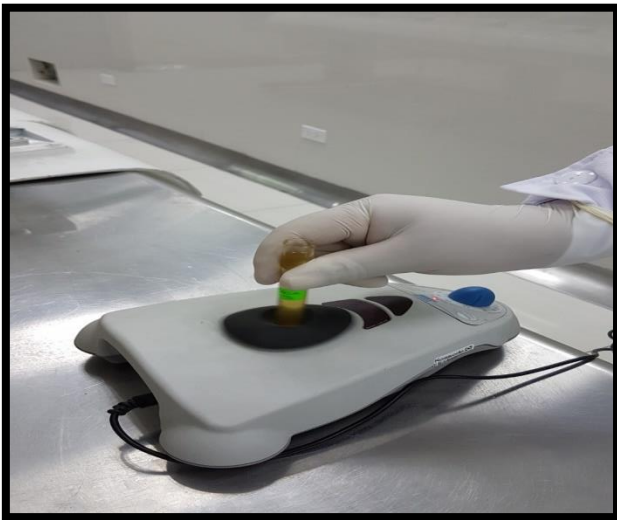
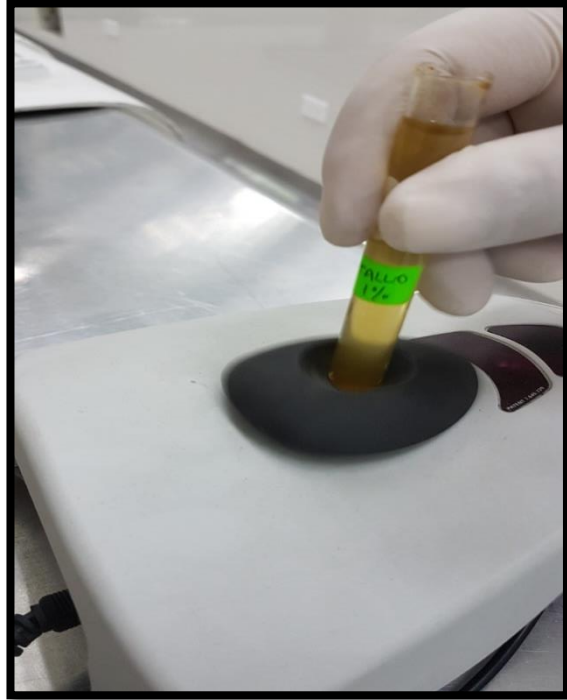


FIGURA 23 homogenizando en Vortex las diluciones para el HET CAM- hojas



FIGURA24 señalizaciones de la cámara de aire para romper el huevo



FIGURA25 eliminar con mucho cuidado la primera membrana blanquecina



FIGURA 24 ruptura de la cascara de la cámara de aire del huevo



FIGURA 25 Exposición de la MCA para el procedimiento de HET CAM



FIGURA 26 Procedimiento de HET CAM control con Hidróxido de sodio

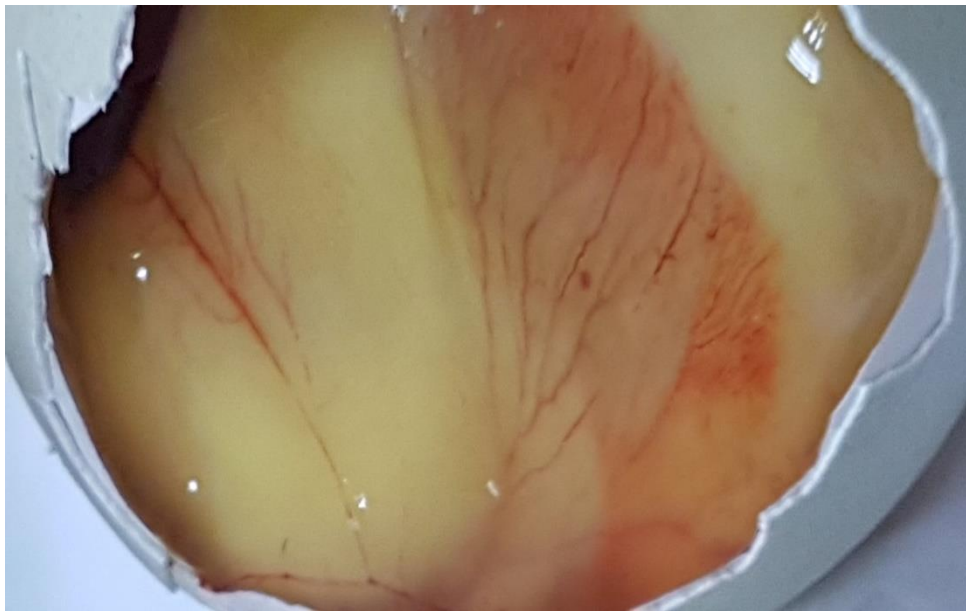


FIGURA 27 Procedimiento de HET CAM control con Lauril sulfato de sodio



FIGURA 28 Procedimiento de HET CAM control con etanol (solvente)



FIGURA 29 Procedimiento de HET CAM control con suero fisiológico

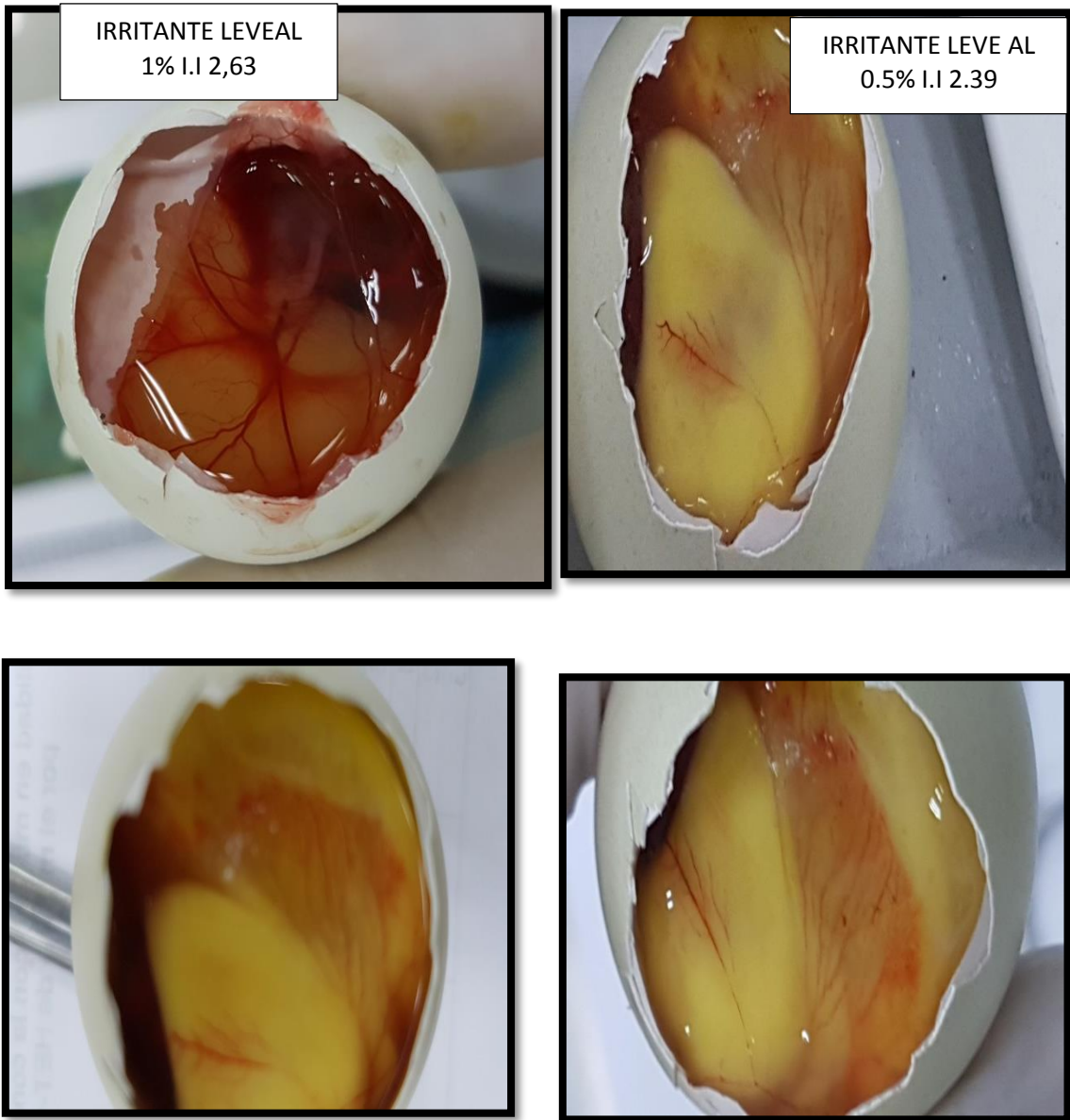


FIGURA 30 Procedimiento de HET CAM del Extracto alcohólico de la Raiz de *Rumex Crispus L.* "Cuturrumasa".

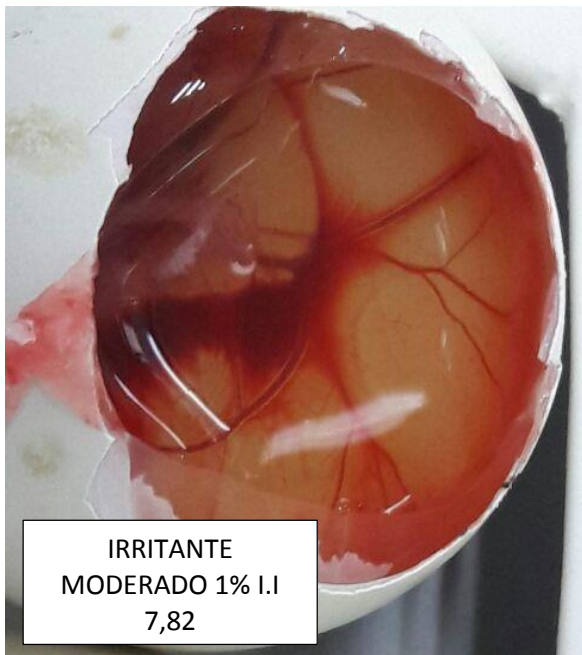
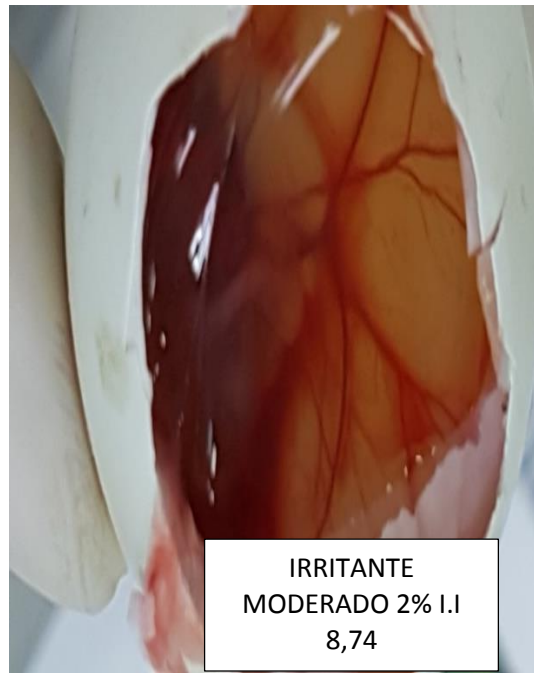
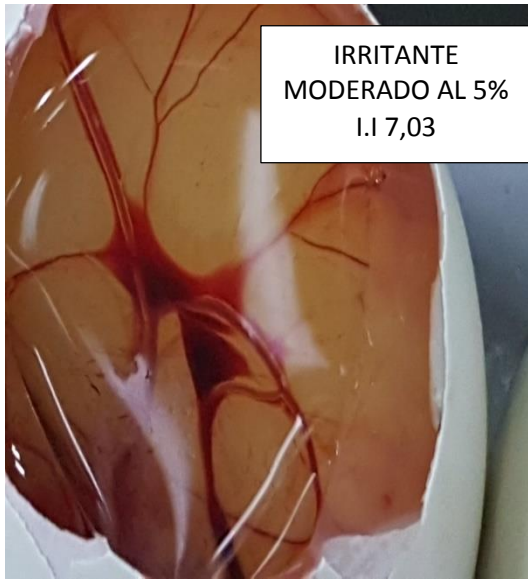


FIGURA 32 Procedimiento de HET CAM del Extracto alcohólico de la Tallo de Rumex Crispus L."Cuturrumasa".



IRRITANTE LEVE AL
1% I.I 3,03

FIGURA 31 Procedimiento de HET CAM del Extracto alcohólico de la Hoja de *Rumex Crispus* L. “Cuturumasa”.