

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

EFECTO ANTIMICÓTICO, *in vitro*, DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LA INFLORESCENCIA *Rumex crispus*
(LENGUA DE VACA) EN CEPAS DE *Trichophyton rubrum* ATCC
28188.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO

Bach.: FABIOLA GABRIELA LÓPEZ GUERRA

ASESOR: Mg. Luis Roa Chunga

Lima – Perú

2018

DEDICATORIA

A Carmen, mi madre, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A Rafael, mi padre, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan, los cuales me han inspirado en todo momento, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor incondicional.

A mis hermanos Cristian, Rafael y a mí abuela Clara por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, así que esto va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí, espero no defraudarlos y contar siempre con su apoyo valioso, sincero e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Roa Chunga, asesor, por el apoyo y amistad que me ha otorgado antes y durante el desarrollo de ésta investigación.

A mis familiares y seres queridos, quienes han sido fuentes de motivación e inspiración, no solo durante el desarrollo de éste proyecto, sino a lo largo de mi vida.

A todas aquellas personas que de distintas maneras me han permitido alcanzar esta meta, la lista es larga y a pesar de que sus nombres no estén en un papel, siempre estarán en mi mente y corazón.

ABREVIATURAS

- **ATCC:** American Type Culture Collection
- **SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences
- **UFC:** Unidad formadora de colonia
- **VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE ANEXOS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.1 Descripción de la realidad problemática	2
1.1.1 Descripción de la realidad problemática	2
1.2 Identificación y formulación del problema	4
1.2.1 Problema general	4
1.2.2 Problemas específicos	4
1.3 Objetivos de investigación	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4 Justificación de la investigación	5
1.5 Limitaciones de la investigación	6

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes de la investigación	7
2.1.1. Antecedentes nacionales	7
2.1.2. Antecedentes internacionales	9
2.2 Bases teóricas	12
2.2.1 <i>Rumex crispus</i> (Lengua de vaca).....	12
2.2.2. <i>Trichophyton rubrum</i>	16
2.2.3. Extracción y extractos	16
2.3 Formulación de las hipótesis	17
2.3.1 Hipótesis general	17
2.3.2 Hipótesis específicas.....	17
2.4 Operacionalización de variables e indicadores.....	18
2.5 Definición de términos básicos	18
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	20
3.1 Tipo de estudio.....	20
3.2 Diseño de investigación	20
3.3 Población	20
3.4 Muestra.....	21
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	21
3.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	21
3.7 Materiales y reactivos	21
3.7.1 Materiales y equipos	21
3.7.2 Reactivos	23
3.8 Procedimiento experimental	24
3.8.1 Recolección.....	24
3.8.2 Ensayo de solubilidad	28
3.8.3 Tamizaje fitoquímico	28
3.8.4 Ensayo antimicótico	29
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
4.1 Resultados	34
4.1.1 Ensayo de solubilidad	34

4.1.2 Tamizaje fitoquímico	35
4.1.3 Ensayo antimicótico	36
4.2 Contrastación de hipótesis	37
4.2.1 Contrastación de hipótesis general	37
4.2.2 Contrastación de hipótesis específicas	38
4.3 Discusión	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1 Conclusiones.....	43
5.2 Recomendaciones.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i>	29
Tabla 2. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i>	34
Tabla 3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i>	35
Tabla 4. Diámetro de los halos de inhibición del ensayo antimicótico.	36
Tabla 5. Comparaciones múltiples mediante el test de Dunnet para el ensayo antimicótico del extracto hidroalcohólico de <i>Rumex crispus</i>	37
Tabla 6. Prueba de normalidad de los halos de inhibición del ensayo antimicótico	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Antraquinonas presentes en las raíces de <i>Rumex crispus</i> . 1: Przewalsquinona B; 2: Ziganeina; 3: 1,3,5-trihidroxi-6-hidroximetil-antraquinona; 4: Rumexina (46).....	15
Figura 2. La quinona como marcador químico de las raíces de <i>Rumex crispus</i> , 1,8-dihidroxi-3-metil-9-antrona (48).....	15
Figura 3. Inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> sobre papel craft dentro de una estufa.....	25
Figura 4. Frasco ambar con 19.34 g de inflorescencia seca y pulverizada. Se está vertiendo etanol de 96°.....	25
Figura 5. Filtración al vacío del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i>	26
Figura 6. Placas petri con el líquido resultante de la evaporación de parte del disolvente de la extracción (extracto hidroalcohólico + disolvente) de inflorescencia de <i>Rumex crispus</i>	27
Figura 7. Pesado del extracto hidroalcohólico seco de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i>	27
Figura 8. Proceso de la preparación del estándar 0.5 de Mc. Farland	30
Figura 9. Proceso de la preparación del inóculo.....	31
Figura 10. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólicos de la inflorescencia de	34
Figura 11. Placa con el resultado del ensayo antimicótico. A: Ext. 1000 mg/ml; B: Ext. 750 mg/ml; C: 500 mg/ml; D: 250 mg/ml; E: Clotrimazol.	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Constancia de clasificación botánica de <i>Rumex crispus</i>	51
Anexo 2. Certificado de análisis de la cepa <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	52
Anexo 3. Certificado de análisis de la cepa <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188 (continuación).....	53
Anexo 4. Certificado de análisis del agar dextrosa Sabouraud.	54
Anexo 5. Certificado de análisis del medio de cultivo, caldo papa dextrosa	56
Anexo 6: Matriz de consistencia.....	58

RESUMEN

El presente estudio de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antimicótico, *in vitro*, del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. La inflorescencia de *Rumex crispus* fue colectada en el distrito de Palca, provincia de Tarma, región Junín en el Perú el mes de marzo del año 2018 y fue secada y pulverizada para posteriormente ser macerada con etanol 96°. El método usado para determinar el efecto antimicótico fue por Kirby-bauer por difusión en discos. El extracto resultante de la maceración se absorbió en discos de difusión para un ensayo antimicótico a 1000; 750; 500 y 250 mg/ml y clotrimazol. Los resultados obtenidos a partir de los discos con el extracto etanólico de *Rumex crispus* a 1000 y 750 mg/ml evidenciaron halos de inhibición de 13.74 ± 0.97 y 11.15 ± 1.06 mm frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. Se concluyó que las concentraciones 1000 y 750 mg/ml presentan efecto antimicótico y ambas presentaron halos de inhibición menores al control positivo.

Palabras clave: *Trichophyton rubrum*, antimicótico, inflorescencia, *in vitro*, tamizaje fitoquímico, macerado

ABSTRACT

The general objective of the present study was the antifungal effect, *in vitro*, the hydroalcoholic extract of the inflorescence of *Rumex crispus* (cow tongue) against the strains of *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. The inflorescence of *Rumex crispus* was collected in the district from Palca, province of Tarma, Junín region in Peru to the month of March of the year 2018 and was dried and pulverized to subsequently be macerated with ethanol 96 °. The method used to determine the antifungal effect was by Kirby-bauer by disc diffusion. The extract resulting from the maceration is absorbed in diffusion discs for an antifungal test at 1000; 750; 500 and 250 mg/ml and clotrimazole. The results obtained from the disks with the ethanolic extract of *Rumex crispus* at 1000 and 750 mg/ml showed haloes of inhibition of 13.74 ± 0.97 and 11.15 ± 1.06 mm against strains of *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. It was concluded that the concentrations 1000 and 750 mg/ml have an antifungal effect and both have lower inhibition zones than the positive control.

Key words: *Trichophyton rubrum*, antimicotic, inflorescence, *in vitro*, phytochemical screening, macerated.

INTRODUCCIÓN

El microorganismo *Trichophyton rubrum* es el principal agente etiológico de las dermatofitosis, que representa al 70 por ciento de ellas (1) y hasta 90 por ciento de infecciones en las uñas (2); además, es responsable aproximadamente del 80 - 93 por ciento de la dermatofitosis recurrentes o crónicas (1). La prevalencia mundial en las uñas es del 10 por ciento y aunque exista tratamiento farmacológico, muchas infecciones de este tipo son intratables o recurrentes (3,4). Una de la micosis con mayor prevalencia en el mundo (3,4) y sobre todo en el Perú son aquellas que son producidas por *Trichophytum rubrum*. (5) Por esta razón, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar las micosis producidas por este hongo es de gran importancia.

La especie *Rumex crispus* es una planta con varios usos tradicionales en Perú y el mundo (6–13), y lograr evidenciar algún efecto biológico de esta especie podría dar lugar a nuevas alternativas terapéuticas. Validar el conocimiento popular de esta planta es un aporte al conocimiento y contribución a la población que la consume desde siempre. Este precedente convierte a *Rumex crispus* en un especie promisoría que podría inspirar a futuras investigaciones y otras alternativas terapéuticas validadas bajo el rigor científico.

En el capítulo I se realiza el planteamiento y formulación del problema estudiado: ¿Tendrá el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) efecto antimicótico *in vitro*, frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188?

En el capítulo II destacamos a los antecedentes nacionales e internacionales, la taxonomía, hábitad y distribución de *Rumex crispus* L y *Trichophyton rubrum*.

En el capítulo III se presenta la metodología, el diseño, la población, las muestras y la técnica utilizada.

En el capítulo IV, Se obtuvo los resultados de los ensayos de solubilidad, tamizaje fitoquímico y ensayo antimicótico.

En el capítulo V se presentan las conclusiones y se hacen las recomendaciones.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

1.1.1 Descripción de la realidad problemática

Trichophyton rubrum es un hongo dermatofito que afecta al ser humano. Es el causante de frecuentes enfermedades de la piel, pie de atleta, tiña y prurito, es también uno de los hongos más frecuentes como en el caso de las onicomicosis dermatofíticas o tricofíticas de manos y pies el *Trichophyton rubrum* fue uno de los más frecuentes (14).

La dermatofitosis es una micosis superficial que afecta al 40 por ciento de población mundial aproximadamente y que representa el 30 por ciento de todas las infecciones micóticas cutáneas (15).

El microorganismo *Trichophyton rubrum* es el principal agente etiológico de las dermatofitosis, que representa el 70 por ciento de ellas (1) y hasta 90 por ciento de infecciones en las uñas (2); además, es responsable aproximadamente del 80 – 93 por ciento de la dermatofitosis recurrentes o crónicas (1). La prevalencia mundial en las uñas es del 10 por ciento y aunque exista tratamiento farmacológico, muchas infecciones de este tipo son intratables o recurrentes (3,4). Es importante mencionar que en los últimos 70 años la incidencia de infecciones por *Trichophyton rubrum* en cabello, piel y uñas se incrementó, sobre todo en ancianos y niños (16–18).

De 7 a 185 casos con dermatomicosis analizados en el Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión entre 1976 – 2005, se mostró una prevalencia del 33,2 por ciento de

dermatofitosis por *Trichophyton rubrum* y el 43,6 por ciento fueron diagnosticados con onicomycosis (5).

La onicomycosis es una de las micosis superficiales con mayor dificultad en el tratamiento; sobre esta, además, recae una elevada tasa de fracaso terapéutico que oscila, según algunos autores, entre el 20 – 50 por ciento. La prevalencia de este tipo de infecciones puede variar entre el 2,5 – 16 por ciento, dependiendo de factores geográficos y de distintos factores predisponentes no siempre conocidos (19). La onicomycosis es muy frecuente en deportistas y militares en retiro y actividad. *Trichophyton rubrum* se ha convertido en uno de los principales agentes etiológicos para los militares peruanos (20,21).

La prevalencia mundial por onicomycosis sigue aumentando a nivel mundial a medida que los factores predisponentes de la onicomycosis se vuelven más prevalentes como diabetes, inmunosupresión, tabaquismo y envejecimiento que son enfermedades y situaciones con alta prevalencia (22).

Las infecciones crónicas de la piel causadas por *Trichophyton rubrum* pueden convertirse en sitios de infección secundaria por otros microorganismos, como *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp.* y *Staphylococcus aureus*, que pueden poner en peligro la vida en pacientes inmunocomprometidos e inmunodeprimidos si la infección secundaria se vuelve sistémica (14,23,24). Además, las infecciones ocasionadas por esos microorganismos tienen altas tasas de mortalidad por sepsis (25).

El costo elevado del tratamiento convencional de la onicomycosis y tiña, enfermedades que pueden ser causadas por *Trichophyton rubrum*, y la dependencia al uso de la medicina tradicional herbaria, conocimiento muy probablemente sin validación científica por parte de la población más pobre del planeta, inspira a los científicos a buscar nuevas alternativas terapéuticas entre los productos naturales (26). Es por eso

que el presente trabajo pretende evidenciar el efecto antimicótico contra *Trichophyton rubrum* de la especie vegetal *Rumex crispus*.

1.2 Identificación y formulación del problema

1.2.1 Problema general

1. ¿Tendrá el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) efecto antimicótico, *in vitro*, frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Presentará el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) un grado de concentración óptimo que genere efecto antimicótico frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188?
2. ¿Presentará el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) metabolitos secundarios que generen efecto antimicótico, *in vitro*?

1.3 Objetivos de investigación

1.3.1 Objetivo general

1. Determinar el efecto antimicótico, *in vitro*, del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el grado de concentración óptimo del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) que genere efecto antimicótico frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

2. Determinar la presencia de metabolitos secundarios que generen efecto antimicótico, *in vitro*, del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca).

1.4 Justificación de la investigación

Las micosis son un serio problema para la salud pública por las enfermedades subyacentes con las que se pueden presentar y también por la mortalidad directa debido a muchas de ellas. Una de la micosis con mayor prevalencia en el mundo (3,4), sobre todo en el Perú, son aquellas que son producidas por *Trichophytum rubrum* (5). Por esta razón, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar las micosis producidas por este hongo es de gran importancia.

Las plantas siempre fueron fuente de refugio, vestimenta, comida, fragancias y sabores, pero sobre todo medicinas, ya que fueron el pilar de los más importantes sistemas de medicina tradicional del mundo. Por esa razón, la etnobotánica y etnofarmacognosia siguen guiando investigaciones para la búsqueda de nuevos principios activos (27).

La especie *Rumex crispus* es una planta promisoría con varios usos tradicionales en Perú y el mundo (6–13), y lograr evidenciar algún efecto biológico de esta especie podría dar lugar a nuevas alternativas terapéuticas. Validar el conocimiento popular de esta planta es un aporte al conocimiento y contribución a la población que la consume desde siempre.

El tratamiento farmacológico convencional no es accesible para gran parte de la población en el mundo, por esta razón, la medicina tradicional herbaria es una práctica muy difundida. En muchos países en vías de desarrollo, es usado entre un 60 a 90 por ciento para atender necesidades de atención primaria y, además, un 80 por ciento de los estados miembros africanos la usan para satisfacer necesidades sanitarias (28). No obstante, la medicina tradicional es una práctica que proviene de un conocimiento empírico que requiere ser

validado, y mucha de esta práctica aún no se valida bajo el rigor del método científico (29); por ello, en esto recae la importancia de este estudio.

Si se logra validar el uso tradicional de la especie *Rumex crispus*, este estudio podría inspirar el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos o a la formulación de posibles nuevos fitomedicamentos.

1.5 Limitaciones de la investigación

El ensayo para determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* podría no ser extrapolable a un modelo *in vivo*, ya que en un organismo vivo existen otras variables que podrían modificar los compuestos con efecto antimicrobiano del extracto como la digestión y el metabolismo hepático.

La distribución de las sustancias experimentales no es uniforme en los discos de difusión con papel filtro, ya que se puede perder extracto por los poros del papel filtro.

Los medios de cultivo usados en el presente ensayo son productos importados, por esa razón requirieron de mucho tiempo de espera para su adquisición (60 días).

La disponibilidad de los laboratorios con instrumentación necesaria para la realización del presente trabajo, fue limitada y estaba sujeta a la cantidad, frecuencia y duración de las cátedras programadas en cada ciclo académico.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Antecedentes nacionales

Sanchez, 2010, en su investigación “Efecto antimicótico del extracto de tres plantas medicinales contra el *Trichophyton sp* *Microsporum sp* in vitro en Tingo María”.

Se planteó evaluar la actividad antimicótica de un extracto alcohólico de *Verbena officinalis*, *Psidium guajava* y *Piper angustifolium* provenientes de Tingo María contra *Trichophyton sp* y *Microsporum sp*. Los extractos ensayados fueron obtenidos por maceración con etanol durante 15 días, los microorganismos se obtuvieron de muestras clínicas y fueron identificados por el método de microcultivos y repicaje para su posterior aislamiento. El método usado para el ensayo antimicótico fue la prueba de sensibilidad de pozos de 6 mm en agar para microorganismos con 48 horas de incubación (27 °C) previamente inoculados. Las concentraciones de los extractos ensayados fue de 10, 40, 70 y 100 por ciento; y entre los resultados más relevantes, mediante el ensayo de la medida del halo de inhibición del crecimiento micótico con pozos, se evidenció 0.58, 0.71, 0.81 y 0.90 mm y 0.53, 0.57, 0.66 y 0.71 de efectividad del extracto de *Piper angustifolium* y *Verbena officinalis* contra *Microsporum sp* y 0.53, 0.62, 0.66 y 0.75 mm frente 1.57 mm del control positivo (clotrimazol) (30).

Moncayo y Santos, 2014, en su investigación “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*”.

Evaluaron el efecto antibacteriano, *in vitro*, del extracto etanólico de la raíz pulverizada y seca obtenida por reflujo (dos horas) de *Rumex crispus* proveniente del distrito de Otuzco en La Libertad frente a dos cepas ATCC de *Escherichia coli*

y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en pozos de agar y por la determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el método de dilución en agar. Las concentraciones usadas en el ensayo de difusión en pozos de agar fueron 5, 15 y 30 por ciento p/v evidenciaron 65, 72 y 83 por ciento de inhibición con respecto a gentamicina 10 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* y 44, 53 y 59 por ciento contra *Escherichia coli* respectivamente y para la determinación de la concentración mínima inhibitoria las concentraciones 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 mg/mL evidenciaron inhibición en el crecimiento bacteriano desde 1 mg/mL frente a *Escherichia coli* y desde 0.5 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*. Ambos ensayos se realizaron 24 horas después de su inoculación equivalente al tubo 0.5 de Mac Farland (10^8 UFC/mL). Además, se evidenció la presencia de catequinas, antocianidinas, flavonoides, quinonas y saponinas (31).

Rosas, 2015, en su tesis “Cinética de extracción del aceite esencial del Kjento Kjento (*Rumex Crispus* L.) Puno”.

El autor realizó ensayos para evaluar la cinética de extracción del aceite esencial de *Rumex crispus*. Los órganos de la especie vegetal estudiada en este ensayo fueron hojas, tallo y raíces colectadas en el distrito de Cuturapi, provincia de Yunguyo en el departamento de Puno. En este ensayo, se evaluó la cinética de la extracción de aceite esencial de las hojas, tallo y raíces de *Rumex crispus* mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor durante 31.3 horas a 25 °C hasta lograr extraer 3.5 mL. Además, se identificaron 35 compuestos por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, entre los que resaltan por su abundancia son algunos ácidos grasos de cadena corta y unos pocos compuestos aromáticos oxigenados (32).

Aguilar, 2015, en su tesis “Efecto del extracto etanólico de *Tropaelum majus* (mastuerzo) sobre micosis inducida por *Trychophyton mentagrophytes* en *Rattus norvegicus*”.

Determinó el efecto antimicótico, *in vivo*, del extracto etanólico de *Tropaelum majus* frente a *Trychophyton mentagrophytes* mediante el método de infección fúngica superficial sobre la piel del lomo de ratas. El extracto en mención se hizo

a partir de la inflorescencia de *Tropaelum majus* proveniente de Trujillo y el mismo fue usado para elaborar un ungüento al 0.4 por ciento. Para el ensayo antimicótico, *in vivo*, se usaron 21 ratas agrupadas en 3 grupos denominados control negativo (vaselina), control positivo (terbinafina 1 por ciento) y experimental (ungüento de *Tropaelum majus* 0.4 por ciento). El ensayo se requirió 7 días para la inoculación y 30 días de tratamiento para la evaluación del efecto antimicótico. El ungüento evidenció efecto estadísticamente significativo (<0.05) con respecto al control negativo según la prueba T de student (33).

2.1.2. Antecedentes internacionales

Yildimir et al., 2001, en su trabajo “Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* extracts”.

Realizaron un ensayo para evaluar el efecto antimicrobiano, *in vitro*, contra cuatro bacterias y un hongo, y cuatro ensayos diferentes para medir la actividad antioxidante de los extractos éter etílico, etanol y agua de las semillas, y hojas de *Rumex crispus* provenientes de Gölova en Turquía. Las hojas fueron colectadas en mayo y las semillas en junio y ambos órganos fueron secado a la sombra y trozados con una licuadora. Luego, se obtuvieron extractos éter etílico mediante una extracción, filtración y concentración con aparato de soxhlet, filtros y un evaporador rotatorio (30 °C). El marco resultante fue usado para macerar con etanol para obtener un extracto etanol después de ser filtrado y secado con filtros y con un evaporador rotatorio. El marco resultante se usó para obtener un extracto agua por decocción durante 15 minutos, filtración y secado con una plancha calefactora, filtros y liofilizador. El método usado en el ensayo antimicrobiano *in vitro* fue Kirby Bauer con discos de difusión en agar con las cepas: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomona aeruginosa*. Todos los extractos usados en el ensayo fueron a la concentración 1 mg/ml. Entre los resultados y conclusiones más relevantes, se encuentra que ninguno de los extractos fue activo contra *C. albicans*, *E. coli* y *P. aeruginosa*; los extractos éter etílico y etanol de las hojas mostraron 1 y 0.8 cm de diámetro de inhibición contra *S. aureus*, los extractos éter etílico y etanol de las hojas evidenciaron 1.1 y 0.8 cm de diámetro de inhibición

contra *B. subtilis* y el extracto éter etílico de las semillas mostraron 1.1 cm de diámetro de inhibición contra *S. aureus* y *B. subtilis* (34).

Choi JC et al. 2004, en su investigación "Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews" .

Realizaron ensayos para evaluar el efecto antimicótico *in vivo* de tres metabolitos secundarios de la raíz de *Rumex crispus* contra *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Corticium sasaki*, *Puccinia recondita* y *Blumeria graminis f. sp. hordei*. Remaceró las raíces frescas de *Rumex crispus* provenientes de Corea para fraccionar por reparto, el producto se extrajo con n-hexano, acetato de etilo, n-butanol y agua; se evaluó el efecto antimicótico de esas fracciones y evidenció que las fracciones n-hexano y acetato de etilo fueron más activas contra *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* y *Blumeria graminis f. sp. hordei*, por esa razón juntaron esas dos fracciones y a partir de ella lograron aislar crisofanol, parietina y nepodina. Entre los resultados más sobresalientes, se encuentra que las concentraciones requeridas para un 50 por ciento de control de la micosis fueron de 4,7 mg/ml de crisofanol, 0,48 mg/ml de parietina y 20 mg/ml de nepodina. Estos agentes mostraron efecto curativo y protector contra las micosis más comunes de la cebada. El crisofanol a 100 mg/ml y la nepodina a 400 mg/ml fueron más efectivos que los fungicidas fenarimol a 30 mg/ml y polioxina B a 100 mg/ml (controles positivos), en condiciones de invernadero, contra micosis de pepino producidas por *Podosphaera xanthii*. Parietin a 30 y 10 mg/ml redujo el desarrollo micosis de pepino como fenarimol a 30 mg/ml y más eficazmente que la polioxina B a 100 mg/ml (35).

Ulukanli et al, 2005, en su investigación "Antimicrobial Activities of Some Plants from the Eastern Anatolia Region of Turkey".

Realizaron ensayos para determinar el efecto antimicrobiano de los extractos n-hexano, acetona y metanol de las partes aéreas y raíces de *Rumex crispus*, planta entera de *Ajuga chamaepitys*, raíces y partes aéreas *Acinos rotundifolius* y planta entera de *Lycopus europaeus* provenientes del este de Turquía contra

cepas de las especies *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* inoculadas a 10^6 UFC/ml en los cultivos bacterianos y 10^4 UFC/ml en los cultivos fúngicos durante 24 horas a 30 °C e incubadas por 48 horas a 37 °C. El método utilizado para evaluar el efecto antimicrobiano fue difusión en agar, usando pozos de 12 mm de diámetro sobre el agar solidificado. Entre los resultados más relevantes, se encuentra que el extracto acetona de las raíces de *Rumex crispus* evidenció un diámetro de 17 mm de inhibición frente a *Candida albicans* y además de ellos se evidenciaron diámetros 20 mm contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *niger* y *Klebsiella pneumoniae* (36).

Avci et al, 2014, en su investigación "In vitro antimicrobial and antioxidant activities and GC/MS analysis of the essential oils of *Rumex crispus* and *Rumex cristatus*".

Realizaron ensayos para evaluar el efecto antimicrobiano aceite esencial de las hojas de *Rumex crispus* y *Rumex cristatus* contra *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y el efecto antioxidante de ambos aceites esenciales por el ensayo de antioxidantes totales de aceites esenciales. Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación con cloroformo etanol y agua a partir de las hojas secas de *Rumex crispus* y *Rumex cristatus*. El ensayo para evaluar el efecto antimicrobiano fue desarrollado por los métodos de difusión en agar con discos y pozos de 6 mm de diámetro y el tiempo de inoculación de todos los microorganismos fue de 24 horas a 37 °C e incubados a la misma temperatura durante 48 horas con una turbidez del inóculo equivalente al estándar 0.5 de Mc Farland. Entre los resultados más relevantes, evidenciaron que los aceites esenciales de las hojas de *Rumex crispus* a 100 mg/ml mostraron 19.2 ± 3 , 18.1 ± 4.4 y 7 ± 1 y 31.5 ± 4.5 , 30.2 ± 2 y 0 mm de diámetro extraídos con etanol, cloroformo y agua por el método de difusión en agar con pozos y discos de 6 mm de diámetro respectivamente. El aceite esencial extraído con agua fue la muestra solo evidenció 8.6 ± 1.4 y 7 ± 1 frente a *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* por el método de difusión en agar con pozos (37).

Gomez C et al., 2003, "Algunos estudios de alelopatía de *Rumex Crispus* L. y *Polygonum segetum* HBK., en Colombia". La lengua de vaca (*Rumex crispus* L.) y la gualola (*Polygonum segetum* HBK.).

Son especies de malezas comunes que crecen en las áreas subtropicales del mundo donde ocasionan grandes pérdidas en cosechas y praderas debido a su agresividad. En Colombia, se encuentran en zonas ubicadas por encima de los 2000 msnm, y son muy difíciles de manejar por su alta competitividad y gran habilidad para propagarse, tanto sexual como vegetativamente; a menudo crecen solas en un campo gracias a su capacidad para prevalecer sobre otras especies de plantas. Con el fin de estandarizar una metodología para la extracción e identificación de algunas sustancias provenientes del metabolismo secundario de las dos especies citadas, se realizaron experimentos para evaluar el efecto de tales compuestos sobre la germinación y desarrollo de especies agrícolas. A través de bioensayos se estableció que los extractos acuosos de hojas y raíces contenían varias sustancias alelopáticas: flavonoides, 5-deoxiflavonas, 7-8-dihidroflavononas y ácidos ferúlico, caféico y sinápico. Los extractos etanólicos de plántulas de *Rumex crispus*, en tres estados de crecimiento, permitieron confirmar la presencia de flavonoides, terpenos, sesquiterpenlactonas, quinonas, glicósidos y cumarinas, pero no de alcaloides. Por otra parte, mediante la utilización de células de *Rumex crispus* en suspensión, se logró aumentar la producción de flavonoides. El conocimiento de la eficacia de las sustancias alelopáticas de estas especies y su uso potencial puede llegar a ser de gran utilidad en programas de manejo de las relaciones planta-planta (38).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Rumex crispus* (Lengua de vaca)

2.2.1.1 Descripción botánica

Hierba erguida perenne desde 40 a 100 cm de alto, con raíces fuertes: Tallos generalmente no ramificados, glabros. Hojas basales semiarrosetadas, laminas lanceoladas a oblongas 20-40 X 4-10 cm, apicalmente agudo, basalmente subcordado ha truncado o cuneado, margen crenado, glabro. Hojas apicales más pequeñas con lamina estrechamente lanceoladas 15-20 X 2-5 cm, apicalmente

acuminado, basalmente truncado, margen crenado, glabro. Inflorescencia en panojas laxa, elongado, ramas haciendo un ángulo de menos de 30 grados al eje principal, inflorescencia parcial en racimos de 10-30 flores de color verdosas; pedicelos 5-12 mm longitud, filiformes, unidos cerca a la base, tépalos externos oblongos 1-2 mm longitud, ligeramente acrescente; valva ampliamente ovadas, algo cordado en la base 3.5-6.5 X 3-4 mm, desarrollados, tubérculo suave. Aquenios trígonos, marrón brillante 2.5-3 X 2-2.5 mm, más amplio a un tercio de la base, gradualmente estrechándose hacia el ápice (39).

2.2.1.2. Habitación y distribución

Vive en suelos húmedos, al borde de las acequias entre 1000 a 3500 metros sobre el nivel del mar (39,40).

Han sido registrados en los departamentos de Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Lambayeque, Lima, La Libertad, San Martín. También en Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá, Caribe, Chile, China, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Japón, México, Nicaragua, Panamá, Sur de África, Sur de Corea, Tailandia, Estados Unidos y Venezuela (39).

2.2.1.3. Clasificación taxonómica

La identificación de esta especie vegetal es bajo el sistema de clasificación de Cronquist 1981: (anexo 1).

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Polygonales

Familia: *Polygonaceae*

Género: *Rumex*

Especie: *Rumex crispus* L.

2.2.1.4 Usos en la medicina tradicional

La población quechua hablante del Callejón de Huaylas en Ancash usa el cataplasma de las hojas machadas para la inflamación de glándulas parótidas y para el dolor de cabeza producido por el sol (6).

En el norte costero del Perú, la planta completa y fresca por vía oral es usada para combatir la infección uterina y su aplicación tópica es usada contra la inflamación interna y vaginal (41).

Las comunidades Muñabi y Suatia, provincia de Lampa, región Puno en el Perú es usado contra golpes y rasmillados (8). En Alasehir-Turquía, las hojas machadas son usada para combatir el reumatismo y las hemorroides (9) y en Estambul-Turquía la infusión de las hojas son usadas como diurético (10). En Aguambu – Bamumbu en Camerún, la administración oral de la infusión de sus raíces son usados contra la sífilis (42). En Zapotitlán de las Salinas, Puebla en México, la administración oral de la infusión de las hojas son usados contra la diarrea (12). La población que habita en el Parque Natural Arrabida en Portugal usa la administración oral de la infusión de las semillas secas contra la diarrea (13). Al lado Norte-Oeste de Molise, en Italia, la decocción de la hoja se emplea para combatir las odontalgias (43). En algunas partes de Irán, el fruto es usado para reducir los niveles de lípidos en sangre y las hojas para reducir la presión arterial (44). En algunos lugares de Sudáfrica, la administración oral de la decocción de las hojas es usada en el dolor de estómago y el tratamiento de heridas (45).

2.2.1.5. Composición química

Rumex crispus es una especie rica en antraquinonas como Przewalsquinona B, metil-antraquinona, ziganeina, 1,3,5-trihidroxi-6-hidroximetil-antraquinona, rumexina (figura 1) (46).

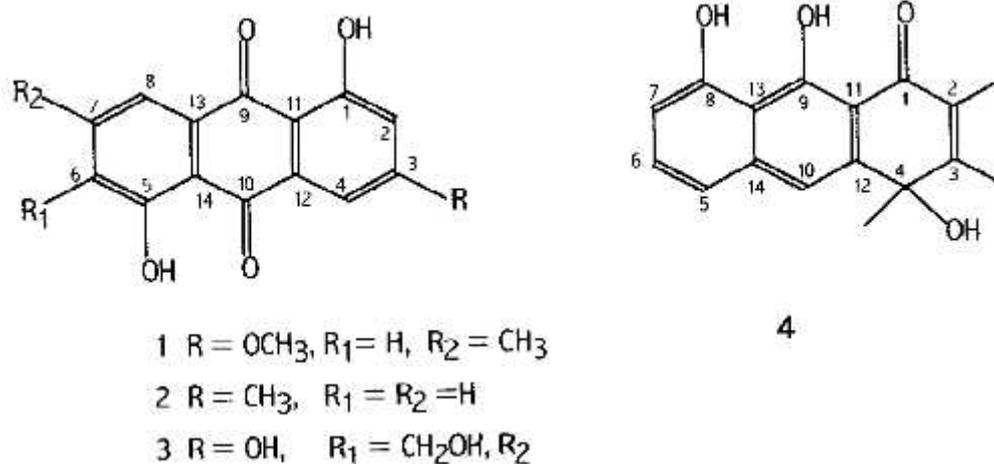


Figura 1. Antraquinonas presentes en las raíces de *Rumex crispus*. 1: Przewalsquinona B; 2: Ziganeína; 3: 1,3,5-trihidroxi-6-hidroximetilantraquinona; 4: Rumexina (46).

Otras de las quinonas presentes en esta especie son ácido crisofánico, emodina y 1,8-dihidroxi-3-metil-9-antrona (47).

Es importante mencionar que las quinonas son constituyentes de interés farmacognóstico en esta especie ya que la quinona, 1,8-dihidroxi-3-metil-9-antrona (figura 3) es marcador químico de las raíces de *Rumex crispus* (48).

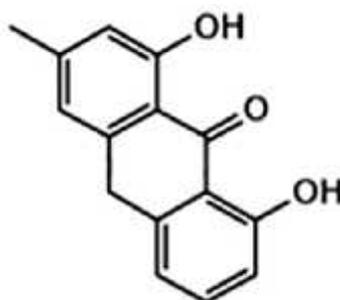


Figura 2. La quinona como marcador químico de las raíces de *Rumex crispus*, 1,8-dihidroxi-3-metil-9-antrona (48).

Otros metabolitos secundarios presentes en esta especie son los flavonoides, quercetina; quercitrina y rutina; Vitamina C y el terpeno -caroteno (49).

Los aceites esenciales de esta especie presentan principalmente monoterpenos, hidrocarburos de cadena abierta con grupos funcionales como cetonas y aldehídos pero en menor cuantía fenilpropanoides (37,50).

2.2.2. *Trichophyton rubrum*

Este hongo es responsable con la capacidad de producir queratinasa, una enzima proteolítica que lisa a la queratina para alimentarse de los péptidos y aminoácidos resultantes (51).

2.2.2.1. Taxonomía

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Onygenales

Familia: *Arthrodermataceae*

Género: *Trichophyton*

Especie: *T. rubrum*

2.2.2.2. Características morfológicas

Trichophyton rubrum es un hongo saprótrofo antropófilo, que coloniza las capas superiores de la piel muerta, y es la causa más común del pie de atleta, infección por hongos en las uñas, comezón y tiña en todo el mundo. Con macroconidias frecuentes, lisas y con pared delgada y con abundantes microconidias esféricas y piriformes (25).

2.2.3. Extracción y extractos

Para la obtención de principios activos de una planta, es preciso usar una técnica de extracción. El producto de la extracción es el extracto (52).

2.2.3.1 Macerado

Técnica de extracción en la que la droga vegetal es sumergida en un disolvente, con el único propósito de ser extraídos con ese disolvente (52).

2.3 Formulación de las hipótesis

2.3.1 Hipótesis general

1. Sí tiene el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) efecto antimicótico, *in vitro*, frente cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

2.3.2 Hipótesis específicas

1. Sí presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) un grado de concentración óptimo que genera efecto antimicótico frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.
2. Sí presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) metabolitos secundarios (quinonas y flavonoides) que generan efecto antimicótico, *in vitro*.

2.4 Operacionalización de variables e indicadores

VARIABLES	INDICADORES	FUENTE	INTRUMENTO
Extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> . (lengua de vaca)) Concentraciones: 1000 mg/ml 750 mg/ml 500 mg/ml 250 mg/ml) Metabolitos secundarios (quinonas, terpenos y compuestos fenólicos)	Diluciones de extracto Tamizaje fitoquímico	Ficha de observación
Efecto antimicótico	Halos de inhibición del crecimiento (mm) de <i>Trichophyton rubrum</i>	Vernier	Ficha de observación

2.5 Definición de términos básicos

Cepa: Grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común es conocida (53).

Droga vegetal: Es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica (54).

Fitomedicamento: Son el producto final utilizado por la fitoterapia que se consigue luego de que se estandariza el extracto y una vez se apliquen las técnicas de la industria farmacéutica (55).

Flavonoides: Son compuestos fenólicos constitutivos, de las plantas, provenientes de la unión de las rutas biosintéticas del ácido shikímico y acetato, con un núcleo 2-fenilcromen-4-ona (52).

Metabolito secundario: Término usado para los compuestos que no intervienen en el metabolismo fundamental de los seres vivos (56).

Medicina tradicional: La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (57).

Micosis: Infección producida por ciertos hongos en alguna parte del organismo (58).

Onicomycosis: Es una infección crónica y progresiva de las uñas causada por hongos (59).

Sepsis: La sepsis es una enfermedad grave. Ocurre cuando el cuerpo tiene una abrumadora respuesta inmunitaria a una infección bacteriana. Las sustancias químicas liberadas a la sangre para combatir la infección desencadenan una inflamación generalizada (60).

Terapéutica: Conjunto de prácticas y conocimientos encaminados al tratamiento de dolencias (61).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio que se empleará para esta investigación será de tipo “experimental”. Para Hernández, Collado y Baptista (2014) los diseños experimentales son los que permiten la manipulación intencionada de una o más variables independientes para analizar las consecuencias que se generan en la variable dependiente. Según este postulado, en este estudio, se manipulará de manera intencionada la variable independiente “Extracto hidroalcohólico de la planta *Rumex Crispus* (Lengua de vaca)” para luego analizar las consecuencias de manipulación que se generarán en la variable dependiente “Efecto antimicótico”. Además, la investigación será de enfoque cuantitativo, ya que se presentarán los resultados a través de mediciones numéricas (nm) para probar las hipótesis planteadas en este estudio.

3.2 Diseño de investigación

La investigación presenta un diseño de estudio de experimento puro, ya que se manipuló la variable independiente (Extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus*) y se midió su efecto sobre la variable dependiente (El efecto antimicótico *in vitro* en cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188). El presente estudio es de corte longitudinal y prospectivo, puesto que las variables no son relacionadas y se miden en un solo determinado momento del ensayo.

3.3 Población

15 Arbustos de *Rumex crispus* provenientes del distrito de Palca, provincia de Tarma, región Junín colectadas en área aproximada de 25 m².

3.4 Muestra

Estuvo conformada por 19.34 g de inflorescencia de *Rumex crispus* provenientes del distrito de Palca.

3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Instrumento a utilizar fue una ficha de observación participante.

3.6 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se procedió a organizar las fichas de recolección y enumerarlas para ser ingresadas a la base de datos en el software SPSS versión 22, bajo las modificaciones planteadas por el investigador.

La información recolectada se analizó con el especialista que nos asignaron en el aula de tecnología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega con una nueva versión de acceso. Para lo cual, se llevó a cabo la aplicación de estadística descriptiva para establecer la distribución de los datos recolectados a través de medidas de tendencia central, dispersión, forma y posición. También se utilizó estadística inferencial para las hipótesis de la investigación. Se presentó los resultados en tablas con su respectiva representación gráfica. Para analizar diferencias significativas de medias independientes de los cuestionarios, se utilizó la prueba paramétrica Test de Dunnet. Se consideró un margen de error estadístico de 5 por ciento.

3.7 Materiales y reactivos

3.7.1 Materiales y equipos

Incubadoras

Autoclave

Balanza analítica

Estufa

Rotavapor

Plancha calefactora

Campana extractora

Cabinas de bioseguridad

Baño maría

Mechero bunsen

Matraz Erlenmeyer 500 mL

Embudo de vidrio

Papel craft

Pabilo

Vortex (agitador para tubos)

Vernier

Pinza punta plana

Placas petri de 100 mm

Marcador de vidrio

Balones de fondo plano de 250 mL y 500 mL

Asa de kolle, en anillo y aguja

Hisopos de Algodón estériles

Tubos 150 x 18 mm

Algodón

Bombilla (propipeta)

Pipetas graduadas de 1, 5, 10, 20 y 25 mL

Gradillas tubos de 150 x 180

Discos (Papel whatman N° 1)

Tijeras

Perforador

Cepa de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

3.7.2 Reactivos

Agar Dextrosa Sabouraud

Solución salina

Cloruro de bario

Ácido sulfúrico

Nistatina estándar en disco

Agua destilada

Hidróxido de sodio

Cloruro férrico

Anhídrido acético

Sulfato de cobre

Tartrato de sodio potasio

Gelatina

Cloruro de sodio

Magnesio

Ácido clorhídrico

Carbonato de sodio

Citrato sodio potasio

-naftol

Nitrato de bismuto

Yoduro de potasio

Ácido nítrico

Cloruro de magnesio

Yodo resublimado

Éter de petróleo

Diclorometano

Cloroformo

Etanol

Metanol

3.8 Procedimiento experimental

3.8.1 Recolección

La recolección de la especie vegetal *Rumex crispus* se realizó en el distrito de Palca, provincia de Tarma, región Junín en el Perú el mes de marzo del 2018. El material recolectado fue almacenado en recipientes acartonados con ventilaciones constantes y transportadas a Lima en una caja con agujeros. Luego, se procedió a seleccionar el material en mejor estado para desechar las inflorescencias incompletas o en proceso de oxidación y acto seguido se limpiaron con un pincel grueso. Después de seleccionadas y limpias, se trozaron para facilitar su posterior secado en una estufa con aire circulante a 40 °C durante 48 horas (figura 3).



Figura 3. Inflorescencia de *Rumex crispus* sobre papel craft dentro de una estufa
Fuente: Elaboración propia, 2018.

El material seco se redujo de tamaño por trituración mecánica (con las manos cubiertas). Se obtuvo 19.34 g de polvo seco y luego fue vertido sobre un frasco de vidrio de color ámbar para una posterior extracción por maceración con etanol de 96° (Figura 4).



Figura 4. Frasco ambar con 19.34 g de inflorescencia seca y pulverizada. Se está vertiendo etanol de 96°.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

El macerado se realizó a temperatura ambiente durante una semana con agitación diaria (2 por día). El líquido resultante se filtró con papel filtro al vacío con whatman N° 1 y un equipo de filtración al vacío (Figura 5).



Figura 5. Filtración al vacío del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus*.
Fuente: Elaboración propia, 2018.

El líquido filtrado se concentró con un rotavapor hasta lograr un volumen de 30 mL para luego ser vertido sobre una placa petri y facilitar la evaporación del disolvente (Figura 6).



Figura 6. Placas petri con el líquido resultante de la evaporación de parte del disolvente de la extracción (extracto hidroalcohólico + disolvente) de inflorescencia de *Rumex crispus*.
Fuente: Elaboración propia, 2018.

Después de la eliminación del disolvente el extracto se almacenó en un pequeño frasco ámbar de vidrio de color ámbar para facilitar el pesado del extracto. Se obtuvo 3.55 g de extracto (Figura 7).



Figura 7. Pesado del extracto hidroalcohólico seco de la inflorescencia de *Rumex crispus*.
Fuente: Elaboración propia, 2018.

3.8.2 Ensayo de solubilidad

Se tomó 6 tubos de ensayo y se colocó en cada uno de ellos 100 mg del extracto crudo y luego se vertió 0.25 mL de los disolventes indicados (Éter de petróleo, diclorometano, cloroformo, etanol, metanol y agua destilada) se agitó. Se observó la formación de mezcla soluble (mezcla homogénea) y mezcla insoluble (mezcla heterogénea) (62).

El presente ensayo se realizó en los laboratorios de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

3.8.3 Tamizaje fitoquímico

El presente ensayo fue realizado en los laboratorios de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

Se disolvieron 0.5 g de extracto seco en 20 mL de metanol (Disolvente que logró disolver todo el extracto en el ensayo de solubilidad) y se vertió 1 mL en cada uno de los 14 tubos de ensayo diferentes. Acto seguido se procedió a ejecutar la marcha fitoquímica descrita a detalle en la tabla 1.

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la inflorescencia de *Rumex crispus*

Posición del tubo	Ensayos	Muestra equivalente	Interpretación
1	Borntrager	25 mg	Quinonas
2	Cloruro férrico	25 mg	Compuestos fenólicos
3	Liebermann-Burchard	25 mg	Terpenos
4	Dragendorff	25 mg	Alcaloides
5	Mayer	25 mg	Alcaloides
6	Wagner	25 mg	Alcaloides
7	Baljet	25 mg	Lactonas, -insaturadas
8	Gelatina	25 mg	Taninos
9	Gelatina-sal	25 mg	Taninos
10	NaOH	25 mg	Antocianinas
11	Benedict	25 mg	Azúcares reductores
12	Fehling	25 mg	Azúcares reductores
13	Molish	25 mg	Carbohidratos
14	Shinoda	25 mg	Flavonoides

Fuente: Elaboración propia, 2018.

3.8.4 Ensayo antimicótico

Preparación del estándar 0.5 de Mc Farland

Se preparó la solución de cloruro de bario 0.048 M: Se pesó 0.499 g de cloruro de bario para, posteriormente, ser disuelto con agua destilada en un matraz aforado de 50 ml.

Se preparó la solución de ácido sulfúrico 0.18 M: Se disolvió 1.01 ml de ácido sulfúrico concentrado en 100 ml.

El estándar 0.5 de Mc. Farland se obtuvo disolviendo 0.5 ml de la solución de cloruro de bario 0.048 M con 95.5 ml de ácido sulfúrico 0.18M.

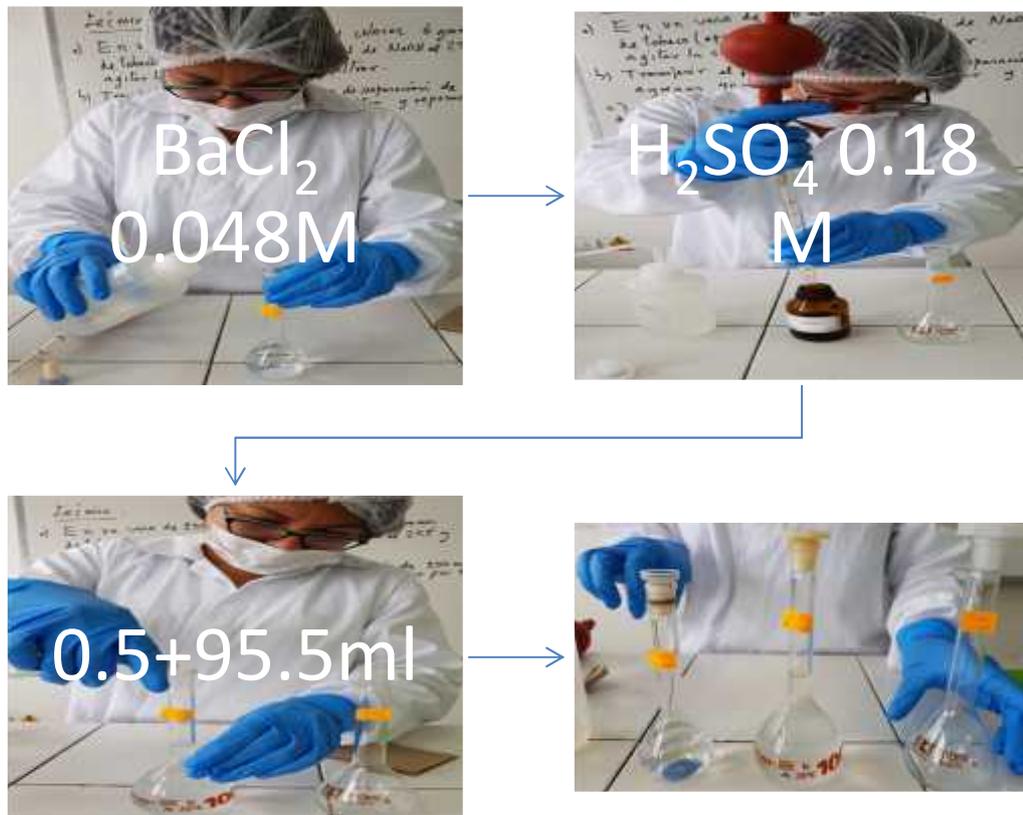


Figura 8. Proceso de la preparación del estándar 0.5 de Mc. Farland
Fuente: Elaboración propia, 2018.

Preparación del inóculo

Se pesó 2.4 g de caldo papa dextrosa para luego ser disuelto con 100 ml de agua destilada. La solución resultante contenida en un frasco de vidrio transparente se esterilizó con una autoclave a 121°C durante 15 min. El caldo esterilizado se vertió a un tubo de ensayo de 15 x 125 mm después de enfriarse.

El producto *Kwik-stik microbiologics*® contiene a la cepa de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 liofilizada en un pelet. El pelet fue disuelto con el líquido que provee el fabricante en la parte superior del *Kwik-stik*. Luego de disuelto el pelet, se procedió a empapar el hisopo que forma parte del producto con la solución que contiene a la cepa para luego homogenizar el mismo hisopo en el caldo esterilizado y recientemente preparado. La cepa reconstituida se incubó a 30 °C por 48 horas.

La turbidez del caldo resultante después de las 48 horas de incubación se ajustó a la turbidez del estándar 0.5 de Mc. Farland con solución salina (NaCl 0.9 por ciento), por comparación visual, se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. La suspensión preparada contendrá aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ (63).



Figura 9. Proceso de la preparación del inóculo
Fuente: Elaboración propia, 2018.

Inoculación de las Placas

Se disolvieron 65.67 g de agar dextrosa sabouraud en 1000 ml de agua destilada. La solución resultante contenida en un frasco de vidrio transparente se esterilizó con una autoclave a 121°C durante 15 min (indicación del fabricante). Después

de este proceso, la solución resultante parcialmente fría se vertió aproximadamente 25 ml en 10 placas petri estériles de 90 x 15 mm para luego dejarlas reposar hasta lograr que gelifiquen.

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se procedió a sumergir en él un asa de siembra calibrada de 10 µl para después inocular a 10 placas con agar dextrosa sabouraud, estriando con el asa de siembra en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo sobre la superficie del medio de cultivo contenido en las 10 placas Petri.

Preparación de los discos

La preparación de los discos de difusión es una operación que se ejecuta en paralelo o antes de la inoculación de las placas. Los discos usados para este ensayo fueron obtenidos con papel filtro whatman N° 1 cortados hasta obtener 9 mm de diámetro previamente esterilizados. En cada placa petri inoculada, se colocaron 5 discos de difusión comprendidos de la siguiente manera:

A: Extracto a 1000 mg/ml

B: Extracto a 750 mg/ml

C: Extracto a 500 mg/ml

D: Extracto a 250 mg/ml

E: 50 µg de clotrimazol

Para lograr las concentraciones descritas, se realizaron las siguientes diluciones:

A: Se disolvieron 2 g de extracto de la inflorescencia de *Rumex crispus* con 2 ml de dimetilsulfóxido.

B: Se disolvieron 1000 µl de A con 333 µl de de dimetilsulfóxido

C: Se disolvieron 100 µl de A con 100 µl de dimetilsulfóxido

D: Se disolvieron 100 µl de A con 300 µl de dimetilsulfóxido

E: 100 mg de Clotrimazol estandar en 20 ml de dimetilsulfóxido.

Los discos fueron embebidos con los extractos a diferentes concentraciones para luego ser puestos sobre la superficie del medio de cultivo sólido de las placas previamente inoculadas con la cepa *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Antes de colocar los discos, se dejará secar los discos a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial (63).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Resultados

4.1.1 Ensayo de solubilidad

El extracto hidroalcohólico seco evidenció solubilidad en disolventes polares y medianamente polares. Se detallan los resultados en la tabla 2 y figura 10.

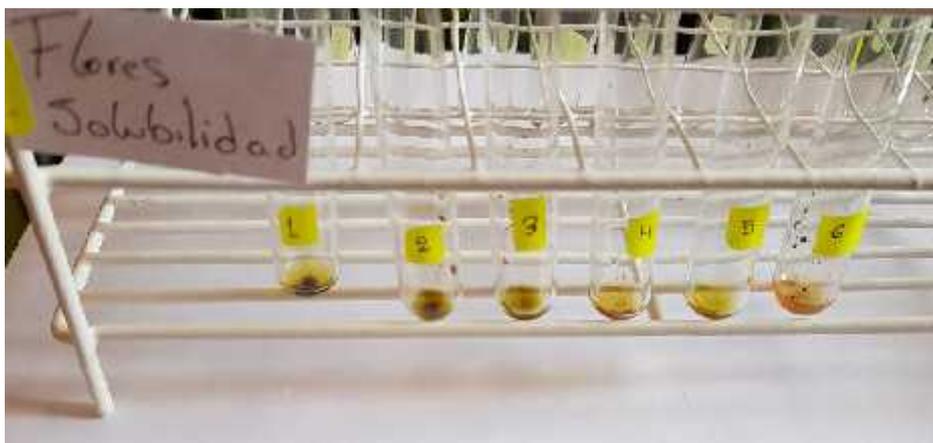


Figura 10. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus*

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Tabla 2. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus*.

Tubo N°	Disolvente	Resultado	Cantidad de extracto
1	Éter de petróleo	+	100 mg
2	Diclorometano	++	100 mg
3	Cloroformo	++	100 mg
4	Etanol	++++	100 mg
5	Metanol	++++	100 mg
6	Agua	+	100 mg

Leyenda:

Ausencia: (-); Leve: (+); Moderado: (++); Medio: (+++) y Abundante: (++++)

Fuente: Elaboración propia, 2018.

4.1.2 Tamizaje fitoquímico

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus*.

Tubo	Ensayos	Interpretación	Demostración	Resultado
N° 1	Borntrager	Quinonas	V gts de éter de petróleo + II gts de NaOH 5%	++++ (Rojo en fase acuosa)
N° 2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	II gts de FeCl ₃ 1%	++++ (Azul muy intenso)
N° 3	Liebermann-Burchard	Terpenos	II gts Ac ₂ O/ H ₂ SO ₄ (50:1) + I gts AcOH	++ (Verde)
N° 4	Dragendorff	Alcaloides	II gts de (A+B/100 ml H ₂ O) A: 8 g Bi (NO ₃) ₃ .5H ₂ O/20 ml HNO ₃ B: 27,2 g/50 ml H ₂ O	+ (ppdo naranja)
N° 5	Mayer	Alcaloides	II gts (A+B/100 ml H ₂ O) A: 1,36 g HgCl/60 ml H ₂ O B: 5 g KI/10 ml H ₂ O	+ (ppdo blanco)
N° 6	Wagner	Alcaloides	II gts de [(1,27 g I ₂ + 2 g KI/5 ml H ₂ O)/100 ml H ₂ O]	+ (ppdo marrón)
N° 7	Baljet	Lactonas , - insaturadas	II gt de (Acido pícrico 1% en EtOH 95° + NaOH 10 %)	-
N° 8	Gelatina	Taninos	II gts gelatina 1%	++++ (ppdo)
N° 9	Gelatina-sal	Taninos	II gts de (1 g gelatina+ 10 g NaCl/100 ml H ₂ O)	++++ (ppdo)
N° 10	NaOH	Antocianinas	II gts NaOH 10%	-
N° 11	Benedict	Azúcares reductores	V gts de [(1,73 g CuSO ₄ .5H ₂ O+17,3 g citrato de sodio+ 10 g Na ₂ CO ₃)/100 ml H ₂ O] y calentar 10'	++++ (ppdo rojo)
N° 12	Fehling	Azúcares reductores	V gts de CuSO ₄ .5H ₂ O 7% + V gts (17,5 g tartrato de sodio potasio + 5 g NaOH/50 ml H ₂ O) y calentar 10'	++++ (ppdo rojo)
N° 13	Molish	Carbohidratos	II gts -naftol + 2 ml H ₂ SO ₄	+ (anillo morado)
N° 14	Shinoda	Flavonoides	Mg + II gts HCl	++ (rojo)

Leyenda:

Ausencia: (-); Leve: (+); Moderado: (++) y Abundante: (++++)

Fuente: Elaboración propia, 2018.

En la tabla 3 se observa que, el extracto hidroalcohólico seco evidenció principalmente presencia de quinonas, taninos, azúcares reductores y flavonoides, en ese orden de prioridad.

4.1.3 Ensayo antimicótico

El ensayo antimicótico no evidencia halos de inhibición para ninguno de los grupos experimentales, pero sí evidencia halos de inhibición del crecimiento de *Trichophyton rubrum*. La tabla 4 y figura 11 muestra a detalle el diámetro de los halos de inhibición.



Figura 11. Placa con el resultado del ensayo antimicótico. A: Ext. 1000 mg/ml; B: Ext. 750 mg/ml; C: 500 mg/ml; D: 250 mg/ml; E: Clotrimazol.
Fuente: Elaboración propia, 2018.

Tabla 4. Diámetro de los halos de inhibición del ensayo antimicótico.

Placa petri	Halos de inhibición (mm)				
	A: 1000 mg/ml	B: 750 mg/ml	C: 500 mg/ml	D: 250 mg/ml	E: Clotrimazol 50 µg
1	14.59	13.56	0	0	17.43
2	14.08	12.02	0	0	17.94
3	14.27	11.5	0	0	18.36
4	13.86	10.47	0	0	17.18
5	12.87	9.88	0	0	17.4
6	13.66	9.99	0	0	16.04
7	13.03	11.01	0	0	16.84
8	11.68	11.15	0	0	17.02
9	14.88	10.98	0	0	17.25
10	14.44	10.98	0	0	18.49
Promedios ± DE	13.74 ± 0.97	11.15 ± 1.06	0	0	17.40 ± 0.73

Leyenda: Los grupos A: Ext. 1000 mg/ml; B: Ext. 750 mg/ml; C: 500 mg/ml; D: 250 mg/ml; E: Clotrimazol. DE: Desviación estándar

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Los resultados de la estadística descriptiva mostrados en la tabla 4 evidencian que los resultados tienen una distribución normal.

Los grupos experimentales A y B evidenciaron halos de inhibición de 13.74 ± 0.97 mm y 11.15 ± 1.06 mm respectivamente, muy por debajo del grupo control.

Tabla 5. Comparaciones múltiples mediante el test de Dunnet para el ensayo antimicótico del extracto hidroalcohólico de *Rumex crispus*.

Grupos	Diferencia de medias	Intervalo de confianza de la diferencia 95 %	Significancia	Decisión
E vs A	3.659	2.843 a 4.475	< 0.0001*	Diferentes
E vs B	6.241	5.425 a 7.057	< 0.0001*	Diferentes
E vs C	17.40	16.58 a 18.21	< 0.0001*	Diferentes
E vs D	17.40	16.58 a 18.21	< 0.0001*	Diferentes

Leyenda:

A: Extracto 1000 mg/ml; B: Extracto 750 mg/ml; C: Extracto 500 mg/ml; D: Extracto 250 mg/ml y E: Clotrimazol 50 µg. *: P< 0.05: Diferencia estadísticamente significativa

Fuente: Elaboración propia, 2018.

El ensayo antimicótico evidenció diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales y el control positivo ($p<0.0001$) por la prueba de Dunnet. Los detalles se muestran en la tabla 5. A pesar de que existe diferencia significativa ($p<0.0001$) entre el grupo control y los grupos experimentales; el grupo A, B, C y D no superan los halos de inhibición del grupo control (clotrimazol 50 µg).

4.2 Contrastación de hipótesis

4.2.1 Contrastación de hipótesis general

Se realizó la contrastación de hipótesis de esta investigación, considerando que la hipótesis general es:

“Sí tiene el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) efecto antimicótico, in vitro, frente cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188”.

La complejidad de la hipótesis general, se subdividió en hipótesis específicas.

4.2.2 Contrastación de hipótesis específicas

Las hipótesis específicas planteadas en esta investigación fueron:

HE1: Sí presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) un grado de concentración óptimo que genera efecto antimicótico frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

HE2: Sí presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) metabolitos secundarios (quinonas y flavonoides) que generan efecto antimicótico, *in vitro*.

Para realizar la docimasia se formuló las siguientes hipótesis estadísticas para determinar si la distribución de los resultados es normal:

H0: Los halos de inhibición de todos los grupos del ensayo antimicótico sigue una distribución normal.

H1: Los halos de inhibición de todos los grupos del ensayo antimicótico no sigue una distribución normal.

En esta investigación se trabajó con un nivel de confianza del 95 %, que corresponde a un nivel de significancia de 5% = 0.05.

Tabla 6. Prueba de normalidad de los halos de inhibición del ensayo antimicótico

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halos de inhibición	A	,169	10	,200 [*]	,921	10	,369
	B	,202	10	,200 [*]	,897	10	,201
	E	,181	10	,200 [*]	,958	10	,758

Leyenda:

A: Extracto 1000 mg/ml; B: Extracto 750 mg/ml; C: Extracto 500 mg/ml; D: Extracto 250 mg/ml y E: Clotrimazol 50 µg.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

El ensayo antimicótico se ejecutó con un tamaño muestral igual a 10, por esta razón se considera los resultados mostrados en de la prueba Shapiro-Wilk (tabla 6). Al encontrarse con el resultado de que los halos de inhibición de los extractos a 1000 mg/ml, 750 mg/ml y clotrimazol con un p-valor mayor a 0.05 se rechazó la hipótesis alternativa, por esta razón se declaró que la distribución de los resultados es normal, lo que sustenta la siguiente prueba estadística. Los resultados del ensayo para extractos a 500 y 250 mg/ml se omitieron porque los resultados que mostraron fue cero.

Para realizar la docimasia de la hipótesis 1 se formuló las siguientes hipótesis estadísticas:

H0: No presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) un grado de concentración óptimo que genera efecto antimicótico frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

H1: Sí presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (lengua de vaca) un grado de concentración óptimo que genera efecto antimicótico frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Se comparó las medias de la variable cuantitativa en cada uno de los grupos que conforma cada estrato o categoría de la variable nominal, por ello se utilizó un modelo matemático más amplio: el Análisis de la Varianza (ANOVA de una vía), que va a permitir explorar entre qué grupos concretos están o no esas diferencias. La tabla 5 evidenció diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales (extracto a 1000, 750, 500 y 250 mg/ml) frente al control positivo ($p < 0.0001$) por la prueba de Dunnett. Las comparaciones múltiples del test de Dunnett evidenció p-valores menores a 0.05, por esta razón se rechazó la hipótesis nula.

4.3 Discusión

El ensayo evidenció un discreto efecto antimicótico (figura 11 y tabla 4) de los discos con extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* a 1000 y 750 mg/ml a diferencia de las concentraciones 500 y 250 mg/ml, que no evidenciaron efecto antimicótico alguno. Los discos de difusión con extractos a 1000, 750, 500 y 250 mg/ml respectivamente mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en sus halos de inhibición frente a los discos de clotrimazol (tabla 5). Otros autores evidenciaron el efecto antimicrobiano de *Rumex crispus* y otras especies del género *Rumex*. En algunas investigaciones, se evidenciaron efecto antifúngico en especies del género. El fruto de las especies *Rumex crispus*, *Rumex acetosa*, *Rumex acetosella*, *Rumex confertus*, *Rumex hydrolapathum* y *Rumex obtusifolius* colectadas en Polonia evidenciaron concentraciones mínimas inhibitorias desde 250 – 500 $\mu\text{g/ml}$ contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Aspergillus niger* (64). Estos resultados refuerzan los obtenidos en el presente trabajo pero muestran mucha mayor actividad biológica con un órgano diferente de otras especies del mismo género taxonómico provenientes de un país diferente mediante un ensayo *in vitro* diferente.

Mediante ensayos para evaluar el efecto antibacteriano y antifúngico por el método de poso y disco de difusión en agar de los aceites esenciales extraídos con cloroformo, etanol y agua de *Rumex crispus* y *Rumex cristalus*, se logró evidenciar halos de inhibición de 18.1 ± 4.4 ; 19.2 ± 3 y 7 ± 1 mm de diámetro producidos por el aceite esencial de *Rumex crispus* extraído con etanol, cloroformo y agua en pozos; 30.2 ± 2 ; 31.5 ± 4.5 y 0 mm de diámetro producidos por el aceite esencial de *Rumex crispus* extraído con cloroformo, etanol y agua en disco; 22.4 ± 5.2 ; 24.4 ± 3.5 y 14.2 ± 1.2 mm de diámetro producidos por el aceite esencial de *Rumex cristalus* extraído con cloroformo, etanol y agua en pozos y 27.1 ± 4 ; 29 ± 6.5 y 0 mm de diámetro producidos por el aceite esencial de *Rumex crispus* extraído con cloroformo, etanol y agua en disco frente al hongo *Candida albicans*, respectivamente (37). Estos resultados refuerzan el resultado del presente trabajo pero a partir de un extracto diferente de la misma especie proveniente de un país diferente. La mayor actividad antimicótica de los dos trabajos antes citados pueden ser debido a una composición química diferente a

la del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* ya que provienen de diferentes técnicas de extracción, diferente origen geográfico y órgano implicado.

Otros autores también publican la negación de la actividad antimicótica de la especie *Rumex crispus* y otras especies del género *Crispus*. Mediante ensayos para evaluar el efecto antibacteriano y antifúngico del extractos éter etílico, etanol y agua de las hojas y raíces de *Rumex crispus* proveniente de Turquía, y se evidenció que ninguno de esos extractos presenta efecto antimicótico, pero sí efecto antibacteriano (34). Un autor diferente evidenció mediante el ensayo antifúngico con discos de difusión que los extractos metanol y hexano de las raíces y extractos hexano, acetona y metanol de las partes aéreas de la especie *Rumex crispus* proveniente de Turquía no presentan efecto antimicótico, aunque el extracto acetona de las raíces sí evidenció un moderado efecto antimicótico contra *Candida albicans* (36). No se evidenció efecto antifúngico a 25; 50 y 100 alguno contra *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, de las especies *Rumex nervosus* y *Rumex abyssinicus* provenientes de Etiopía aunque si evidenció efecto antibacteriano (65).

El moderado efecto antimicótico de los discos de difusión con extractos etanólicos de las inflorescencias de *Rumex crispus* al 1000 y 750 mg/ml frente a *Trichophyton rubrum* puede ser debido a la presencia de quinonas o flavonoides, ya otros autores lograron aislar 1,3,8-trihidroxi-6-metilantraceno-9,10-diona, una quinona con efecto antifúngico contra *Trichophyton rubrum*, guiados por ensayos antimicóticos contra *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* *Trichophyton mentagrophytes* y *Ascosphaera apis* a partir de planta entera de *Rumex cyprius* (66). Además se publica que uno de los constituyentes principales de las especies del género *Rumex*, por su amplia difusión y por la variedad de efectos biológicos, es la quercetina (67) y este flavonoides, quercetina, evidenció el efecto antimicótico contra *Trichophyton rubrum* (68).

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* evidenció la presencia de quinonas y taninos en mayor abundancia y terpenos, flavonoides y alcaloides en menor proporción. Vasas y col. (2015) Publican que las especies del género *Rumex* son ricas en antraquinonas,

naftalenos, flavonoides, estilbenos, triterpenos, carotenoides y ácidos fenólicos (67).

Soto y col. (2015) También evidenciaron la presencia de quinonas y taninos como metabolitos mayoritarios provenientes de un extracto de raíces de *Rumex crispus* colectada en La libertad (69) al igual que Moncayo y Santos (2014) a partir de la misma especie proveniente de la misma región (31). Además que Choi y col. (2004) Aislaron y evidenciaron que las quinonas son metabolitos secundarios mayoritarios en las raíces de *Rumex crispus* proveniente de Corea (35).

Mojab y col (2003) Determinaron la presencia de flavonoides, taninos y saponinas en el extracto metanólico, por extracción con soxhlet, de las partes aéreas de *Rumex crispus* proveniente de Iran por reacciones de coloración y precipitación. Pero niega la presencia de alcaloides (70).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. El extractos hidroalcohólico de la inflorescencia de *Rumex crispus* (Lengua de vaca) a la concentración de 1000 y 750 mg/ml presentan efecto antimicótico *in vitro* frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188
2. El extracto hidroalcohólico de la inflorescencia *Rumex crispus* (lengua de vaca) presenta quinonas, taninos, azúcares reductores y flavonoides.

5.2 Recomendaciones

1. Realizar investigaciones para evidenciar los posibles efectos tóxicos tópicos y sistémicos (agudos y crónicos) del extracto de la inflorescencia y otros órganos de *Rumex crispus*.
2. Continuar investigaciones químicas y farmacológicas *in vivo* e *in vitro* de otros órganos de *Rumex crispus* para identificar compuestos químicos con efecto antifúngico.
3. Continuar con investigaciones farmacológicas sobre el extracto de la inflorescencia para potenciar su modesto efecto antimicótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weitzman I, Corporis T, Favosa T. The Dermatophytes. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1995;8(2):240–59. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/CMR.8.2.240>
2. Warrillow AGS, Parker JE, Price CL, Garvey EP, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, et al. The thiazole VT-1161 is potent inhibitor of *Trichophyton rubrum* through its inhibition of *T. rubrum* CYP51. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2017;61(7):1–11. Disponible en: <http://aac.asm.org/content/61/7/e00333-17.full.pdf+html>
3. Santos DA, Hamdan JS. In vitro antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. Med Mycol [Internet]. 2006;44(4):357–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13693780500536893>
4. Jackson CJ, Barton RC, Kelly SL, Evans EGV. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. J Clin Microbiol [Internet]. 2000;38(12):4527–34. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/38/12/4527>
5. Béjar V, Villanueva F, Guevara JM, González S, Vergaray G, Abanto E, et al. Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. An la Fac Med [Internet]. 2014;75(2):167–72. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/8380>
6. Gonzales De La Cruz M, Baldeón Malpartida S, Beltrán Santiago H, Jullian V, Bourdy G. Hot and cold: Medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). J Ethnopharmacol [Internet]. 2014;155(2):1093–117. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.042>
7. Bussmann RW, Malca G, Glenn a., Sharon D, Nilsen B, Parris B, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. J Ethnopharmacol [Internet]. 2011;137(1):121–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.071>
8. Pauro JJ, Gonzáles F, Gamarra BM, Pauro JR, Mamani F, Huerta RB. Plantas alimenticias medicinales y biocidas de las comunidades de muñabi y suatia, provincia de lampa (Puno-Perú). Ecol Apl. 2011;10(1):41–9.
9. Ugulu I. Traditional ethnobotanical knowledge about medicinal plants used for external therapies in Alasehir , Turkey. Int J Med Aromat Plants [Internet]. 2011;1(2):101–6. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123300059>
10. Bulut G. Folk medicinal plants of solivri (istanbul, turquia). Marmara Pharm J [Internet]. 2011;15(1):25–9. Disponible en: <http://dspace.marmara.edu.tr/handle/18832014/1429>

11. Focho DA, Newuh MC, Anjah MG, Nwana FA, Ambo FB. Ethnobotanical survey of trees in Fundong, Northwest Region, Cameroon. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2009;5.
12. Hernández T, Canales M, Avila JG, Duran A, Caballero J, Romo de Vivar A, et al. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J Ethnopharmacol*. 2003;88(2–3):181–8.
13. Novais MH, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J Ethnopharmacol*. 2004;93(2–3):183–95.
14. Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, Dupin N, Puel A, Lortholary O, et al. Severe dermatophytosis and acquired or innate immunodeficiency: A review. *J Fungi* [Internet]. 2015;2(1):4. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2309-608X/2/1/4>
15. Sigurgeirsson B, Baran R. The prevalence of onychomycosis in the global population – A literature study. *J Eur Acad Dermatology Venereol* [Internet]. 2014;28(11):1480–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.12323>
16. Adams C, Athanasoula E, Lee W, Mahmudova N. Environmental and genetic factors on the development of onychomycosis. *J Fungi* [Internet]. 2015;1(2):211–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/jof1020211>
17. Oke OO, Onayemi O, Olasode OA, Omisore AG, Oninla OA. The prevalence and pattern of superficial fungal infections among school children in Ile-Ife , South-Western Nigeria. *Dermatol Res Pract* [Internet]. 2014;2014:1–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/842917>
18. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* [Internet]. 2008;166(5–6):335–52. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9100-9>
19. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Santos P, Cárdenes D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2010;27(2):49–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.007>
20. Valdivia-Blondet L, Escalante-Jibaja E, Domínguez N, Correa C, Quintero J, Córdova A, et al. Estudio etiológico de la onicomiosis pies en personal militar en formación. *Dermatol Peru* [Internet]. 2000;10(2). Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v10_n2/estud_etiol_onicomiosis.htm
21. Casanova-Claure E, Navarrete-Mejía P. Perfil epidemiológico y características clínicas de la onicomiosis en población militar. *Med Cutan Iber Lat Am* [Internet]. 2017;45(3):191–4. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2017/mc173d.pdf>
22. Gupta AK, Versteeg SG, Shear NH. Onychomycosis in the 21st century: An update on diagnosis, epidemiology, and treatment. *J Cutan Med Surg*.

- 2017;21(6):525–39.
23. Mays SR, Bogle MA, Bodey GP. Cutaneous fungal infections in the oncology patient. *Am J Clin Dermatol* [Internet]. 2006;7(1):31–43. Disponible en: <http://link.springer.com/10.2165/00128071-200607010-00004>
 24. Virgili A, Zampino MR, Mantovani L. Fungal skin infections in organ transplant recipients. *Am J Clin Dermatol* [Internet]. 2002;3(1):19–35. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11817966
 25. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. 6ª ed. Delgado-Iribarren A, editor. Madrid: Elsevier; 2009. 947 p.
 26. Nkongmeneck BA, Mapongmetsem PM, Pinta Y V, Nkuinkeu R, Tsabang N, Fongzossie E, et al. Etat des lieux des plantes m{éd}icinales importantes {à} conserver et des jardins des plantes m{éd}icinales {à} promouvoir. Geneva: Rapport CEN/OMS/MEM; 2007.
 27. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2006;27(1):1–93. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
 28. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005 [Internet]. 1ª ed. Ginebra: OMS; 2005. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf
 29. Cordell G a. Phytochemistry and traditional medicine - The revolution continues. *Phytochem Lett* [Internet]. 2015;10(4):xxviii–xl. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2011.05.005>
 30. Sanchez FD. Efecto antimicótico del extracto de tres plantas medicinales contra el *Trichophyton* sp *Microsporum* sp in vitro en Tingo Maria [Internet]. Universidad Nacional Agraria de la Selva; 2010. Disponible en: <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/766>
 31. Moncayo NK, Santos AA. 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*. Universidad nacional de trujillo; 2014.
 32. Rosas VR. Cinética de extracción del aceite esencial del kiento kiento (*Rumex crispus*) [Internet]. Universidad nacional del altiplano; 2015. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3520>
 33. Aguilar DA. Efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre micosis inducida por *Trichophyton mentagrophytes* en *Rattus norvegicus*. Universidad nacional de trujillo; 2015.
 34. Yıldırım A, Mavi A, Bo B. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L extracts. *J Agric Fod Chem* [Internet]. 2001;49(8):4083–9. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1021/jf0103572>

35. Choi GJ, Lee SW, Jang KS, Kim JS, Cho KY, Kim JC. Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop Prot* [Internet]. 2004;23(12):1215–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2004.05.005>
36. Ulukanli Z, Ulukanli S, Ozbay H, Ilcim A, Tuzcu M. Antimicrobial activities of some plants from the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Pharm Biol* [Internet]. 2005;43(4):334–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13880200590951757>
37. Avci E, Avci GA, Kose DA, Emniyet AA, Suicmez M. In vitro antimicrobial and antioxidant activities and GC / MS analysis of the essential oils of *Rumex crispus* and *Rumex*. *J Biol Chem* [Internet]. 2014;42(2):193–9. Disponible en: <http://www.hjbc.hacettepe.edu.tr/journal/volume-42/issue-2/in-vitro-antimicrobial-and-antioxidant-activities-and-gc-ms-analysis-of-the-essential-oils-of-rumex-crispus-and-rumex-cristatus/>
38. Gómez C, Arango R, Arévalo LP, Delgado C, Guzmán MR, León SM, et al. Algunos estudios de alelopatía de *Rumex crispus* L y *Polygonum segetum* HBK en Colombia. *Rev Corpoica*. 2003;4(1):42–8.
39. Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. 1ª ed. Lima: CBC; 1999. 556 p.
40. Mondragon J. Polygonaceae *Rumex crispus* l. lengua de vaca [Internet]. 2009 [citado 7 de marzo de 2018]. p. 1. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/polygonaceae/rumex-crispus/fichas/ficha.htm#4>. Habitat
41. Bussmann RW, Glenn A. Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2010;6:1–12.
42. Focho D a, Ndam WT, Fonge B a. Medicinal plants of Aguambu – Bamumbu in the Lebialem highlands , southwest province of Cameroon. *African J Pharmancy Pharmacol*. 2009;3(1):1–13.
43. Botanico O, li NF, Foria V. Traditional uses of plants in North-Western Molise (Central Italy). 2006;(January 2006):29–36.
44. Baharvand-Ahmadi B, Bahmani M, Zargaran A. A brief report of Rhazes manuscripts in the field of cardiology and cardiovascular diseases in ethnobotany of different areas in Iran. *Int J Cardiol*. 2016;207(1):190–1.
45. Wintola OA, Afolayan AJ. Ethnobotanical survey of plants used for the treatment of constipation within Nkonkobe Municipality of South Africa. *South African J Bot*. 2010;9(45):7767–70.
46. Günaydin K, Topçu G, Marana Ion R. 1,5-dihydroxyanthraquinones and an anthrone from roots of *Rumex crispus*. *Nat Prod Lett* [Internet]. 2002;16(1):65–70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/1057563029001/4872>
47. Khan AA. The isolation of 1,8-dihydroxy-3-methyl-9-anthrone from the root

- of *Rumex crispus* linn. *Can J Chem* [Internet]. 1963;41(6):1622–3. Disponible en: <https://doi.org/10.1139/v63-222>
48. Palani S, Pogaku PR, Penthala S, Narayana PS. Pharmacognostic and physicochemical standardization of homoeopathic drug: *Rumex crispus* L. *Indian J Res Homeopath* [Internet]. 2016;10(2):119–25. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/0974-7168.183878>
 49. Kumari S. Identification of anticancer compounds from *Rumex crispus* root. Stephen f austin state university; 2007.
 50. Miyazawa M, Kameoka H. Constituents of essential oil *Rumex crispus*. *J Japan Oil Chem Soc* [Internet]. 1983;32(1):45–7. Disponible en: <https://doi.org/10.5650/jos1956.32.45>
 51. Angulo AG, Bravo N, Falco A, Pulido AM, Rivera Z, Cavallera E. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*: Experiencia de 10 años en el fepartamento de micología del instituto de biomedicina. *Dermatología Venez.* 2008;46(4):46–51.
 52. Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 1999. 515 p.
 53. Real Academia Española. Ceba [Internet]. 2017 [citado 4 de abril de 2018]. p. 1. Disponible en: <http://dle.rae.es/?id=8HccZ0a>
 54. Cañigueral S, Dellacassa E, Bandoni AL. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farm Bonaer.* 2003;22(3):265–77.
 55. Morales MA, Gonzales EA, Morales JP. Fitoterapia, medicamentos herbales y automedicación. En: Chateauneuf R, Benavidesm M, editores. *Plantas medicinales y medicina natural.* Ocho libros; 2014.
 56. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 3ª ed. Lima: Pontificia universidad catolica del Perú; 2016. 287 p.
 57. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización mundial de la salud ginebra; 2014.
 58. Real Academia Española. Micosis. 2017. p. 1.
 59. Wikipedia. Tinea unguium [Internet]. 2015 [citado 10 de marzo de 2018]. p. 1. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Discusión:Tinea_unguium
 60. Medlineplus. Sepsis. Biblioteca nacional de medicina de eeuu. p. 1.
 61. Real Academia Española. Terapéutica. Diccionario de la Real Academia Española. 2016.
 62. Durst DH, Gokel GW. Química orgánica experimental. Casellas M, Granado R, editores. Barcelona: reverté; 1985.
 63. Sacsquispe Contreras RE, Velásquez Pomar J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco

- difusión. Lima: Instituto nacional de salud; 2002. 68 p.
64. Wegiera M, Kosikowska U, Malm A, Smolarz HD. Antimicrobial activity of the extracts from fruits of *Rumex L.* species. *Cent Eur J Biol.* 2011;6(6):1036–43.
 65. Getie M, Gebre-Mariam T, Rietz R, Höhne C, Huschka C, Schmidtke M, et al. Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia.* 2003;74(1–2):139–43.
 66. Husein AI, Al-Nuri MA, Zatar NA, Jondi W, Saleem M, Ali-Shtayeh. Isolation and antifungal evaluation of *Rumex cyprius* Murb extracts. *J Chem Chem Eng [Internet].* 2012;6(6):547–50. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.720.1882&rep=rep1&type=pdf>
 67. Vasas A, Orbán-Gyapai O, Hohmann J. The genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol [Internet].* 2015;175:198–228. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.001>
 68. Bitencourt TA, Komoto TT, Massaroto BG, Miranda CES, Beleboni RO, Marins M, et al. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Complement Altern Med [Internet].* 2013;13. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-229>
 69. Soto MR, Soto K, Santos AA, Moncayo NK. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. *Química Viva [Internet].* 2015;14(3):63–70. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v14n3/moncayo.pdf>
 70. Mojab F, Kamalinejad M, Ghaderi N, Vahidipour HR. Phytochemical Screening of Some Species of Iranian Plants. *Iran J Pharm Res [Internet].* 2003;2(2):77–82. Disponible en: http://ijpr.sbm.ac.ir/?_action=articleInfo&article=16

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de clasificación botánica de *Rumex crispus*

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta proporcionada por, FABIOLA GABRIELA LOPEZ GUERRA, ha sido estudiada científicamente y determinada como ***Rumex crispus*** y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Caryophylliidae
Orden: Polygonales
Familia: Polygonaceae
Género: ***Rumex***
Especie: ***Rumex crispus*** L.

Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Lima, 12 marzo 2018


Blgo. Hamilton Beltrán

Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
CRP 2719

Anexo 2. Certificado de análisis de la cepa *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

10-2018-01-01



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: <i>Trichophyton rubrum</i> Catalog Number: 0444 Lot Number: 444-81** Reference Number: ATCC® 28188™** Purity: Pure Passage from Reference: 2</p>	<p>Expiration Date: 2020/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2018/3/29</p>
---	---

Performance	
<p>Macroscopic Features: Large, white colonies with "fuzzy" appearance and smaller, dark wine-red colonies which turn white with dark wine-red reverse as culture ages. At 14 days, colonies and reverse may not be completely white.</p> <p>Microscopic Features: Microconidia are abundant; macroconidia are rare. Microconidia are thin, clavate, borne laterally on undifferentiated hyphae or on short stalks. Macroconidia are typically long, narrow, cylindrical with rounded apices, 3-8 celled with thin smooth walls.</p>	<p>Medium: Malt Extract Agar</p> <p>Method: Lactophenol Blue (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.</p>	<p>Other Features/ Challenges: Results Dermatophyte Test Medium: positive (good growth at 7 days with agar turning deep pink)</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

▲ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.


 ACCREDITED
 REFERENCE MATERIAL PRODUCER
 CERT #2655.02

(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.


 ACCREDITED
 TESTING CERT #2655.01

Anexo 3. Certificado de análisis de la cepa *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 (continuación)

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Trichophyton rubrum
 Sample Description: 0444
 Sample ID: 444-81
 Sample Creation Date/Time: 2018-03-27T18:14:19.190 CC/KG/TB
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
E4 (+++)(A)	444-81	Trichophyton rubrum_CC6	2.21

Comments:

Isolates of DIFFERENT SPECIES are closely related and currently hard to distinguish on species level. Appropriate species of such a group are marked with the same number after the "_CC" extension. Members of _CC6 group are Trichophyton equinum / interdigitale / mentagrophytes / rubrum / tonsurans / violaceum and were marked as "Genus species_CC6" to show that these species belong to the same group.

Anexo 4. Certificado de análisis del agar dextrosa Sabouraud.

HIMEDIA[®] Certified : ISO 9001:2008, ISO 13485-2003 and WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
22, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400016
Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : N043	Material Name : Sabouraud Dextrose Agar	Lot No : 0900303388
Report No.: 04000734253	Date of Report : 13.06.2017	Expiry Date : Jun-2022

Appearance
Cream to yellow homogeneous free flowing powder. Observed : Light yellow

Gelling
Firm, comparable with 1.5% Agar gel

Colour and Clarity of prepared medium
Light amber coloured clear to slightly opalescent gel forms in Petri plates

Reaction
Reaction of 6.5% w/v aqueous solution at 25°C.

pH
pH Range : 5.40-5.80 Observed : 5.77

Cultural Response
Growth Promotion was carried out in accordance with the (USP/EP/BP/JP), after an incubation at 20-25 °C for 24-48 hours. Recovery rate is considered as 100% for bacteria growth on Soybean Casein Digest Agar and fungus growth on Sabouraud Dextrose Agar

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Observed Lot value (CFU)	Recovery	Incubation temperature	Incubation period
Cultural Response						
<i>Candida albicans ATCC 16211</i>	87	Luxuriant (white colonies)	80	91%	25°C	48Hours
<i>Aspergillus brasiliensis ATCC 16404</i>	79	luxuriant	75	94%	25°C	5Days
<i>Candida albicans ATCC 2091</i>	82	luxuriant	81	98%	25°C	48Hours
<i>Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763</i>	89	luxuriant	82	92%	25°C	48Hours
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	80	luxuriant	76	95%	25°C	48Hours
<i>Escherichia coli ATCC 8739</i>	82	luxuriant	77	93%	25°C	48Hours
<i>Escherichia coli NCTC 9002</i>	80	luxuriant	76	95%	25°C	48Hours
<i>Trichophyton rubrum ATCC 28191</i>		luxuriant	-	-	25°C	5Days
<i>Lactobacillus casei ATCC 334</i>	82	luxuriant	77	93%	25°C	48Hours

• Key: *Formerly known as *Aspergillus niger*.
• ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
• NCTC and National Collection of Type Culture are registered trade mark of the Health Protection Agency

Control Media :
• For Bacteria : Soyabean Casein Digest Agar / Columbia Blood Agar base enriched with 5% v/v Sheep/Horse blood.
• For Yeast & Mold : Sabouraud Dextrose Agar.

HiMedia Laboratories Private Limited

23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086

Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M063	Material Name : Sabouraud Dextrose Agar	Lot No : 0000303388
Report No.: 040000734253	Date of Report : 13.06.2017	Expiry Date : Jun-2022

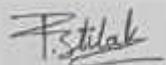
- All ISO 11133 : 2014 (E) control strains are included in the Quality parameter
- HiMedia Laboratories Pvt Ltd is certified for ISO 9001-2008, ISO 13485-2003 and WHO GMP.

Information for BSE/TSE Risk The material was subjected to pH \leq 7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) and dioxine are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal Preservation Act Govt. of Maharashtra, India.

STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED

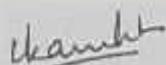
This is to certify that this lot passes and it confirms to the above mentioned tests and specifications. The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particular use, other than that specified in the current HiMedia manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

This document has been produced electronically and is valid



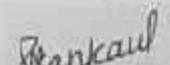
Prachi Patilkar

Microbiologist/Sr.Executive
Microbiologist



Urvashi M. Kokate

Asst./Dy/QC Manager



Dr. Ganesh Kaul

Dy/QA Manager

13.06.2017

Anexo 5. Certificado de análisis del medio de cultivo, caldo papa dextrosa

		Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012, WHO GMP	
HiMedia Laboratories Private Limited 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400046, Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com			
Certificate of Analysis, Quality and Conformity			
Material Code : M403	Material Name : Potato Dextrose Broth	Lot No : 0000338782	
Report No. : 040000018769	Date of Report : 19.05.2018	Expiry Date : Apr-2023	
Appearance Off-white to yellow homogeneous free flowing powder . Observed : Off white			
Colour and Clarity of prepared medium Light amber coloured clear to slightly opalescent solution in tubes			
Reaction Reaction of 2.4% w/v aqueous solution at 25°C.			
pH pH Range : 4.90-5.30 Observed : 5.20			
Cultural Response Cultural characteristics observed after an incubation at 25-30°C for 4-5 days.			
Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Asospore formation
Cultural Response			
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 (WDCM 00051)	50-100	luxuriant	negative
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (WDCM 00054)	50-100	luxuriant	negative
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 (WDCM 00058)	50-100	luxuriant	positive
. ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection . NCTC and National Collection of Type Culture are registered trade mark of the Health Protection Agency			
. All ISO 11133 : 2014(E) control strains are included in the Quality parameter . HiMedia Laboratories Pvt Ltd is Certified for ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP			
STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED			
This is to certify that this lot passes and it confirms to the above mentioned tests and specifications . The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particular use			



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012, WHO GMP

HIMEDIA Laboratories Private Limited
23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
Mumbai - 400086 . Website : www.himedialabs.com,
Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M403	Material Name : Potato Dextrose Broth	Lot No : 0800338782
Report No.: 040000818769	Date of Report : 19.05.2018	Expiry Date : Apr-2023

other than that specified in the current HIMEDIA manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

This document has been produced electronically and is valid

Microbiologist/Sr.Executive
Microbiologist

Asst./Dy/QC Manager

Dy/QA Manager

19.05.2018

Anexo 6: Matriz de consistencia

EFFECTO ANTIMICÓTICO <i>in vitro</i> DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA PLANTA <i>Rumex crispus</i> (LENGUA DE VACA) EN CEPAS DE <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 10218.						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA	INTRUMENTOS
			VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	TIPO	
¿Tendrá el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) efecto antimicótico, <i>in vitro</i> , frente a cepas de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188?	Determinar el efecto antimicótico, <i>in vitro</i> , del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) frente a cepas de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	Sí tiene el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) efecto antimicótico, <i>in vitro</i> , frente a cepas de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	Extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> .	Tamizaje fitoquímico	1.Prospectivo 2.Cuantitativo aplicado	Ficha de recolección de datos
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPOTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	NIVEL	
1. ¿Presentará el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) metabolitos secundarios que generen efecto antimicótico, <i>in vitro</i> ?	1. Determinar la presencia de metabolitos secundarios que generen efecto antimicótico, <i>in vitro</i> , del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca).	1. Sí presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) metabolitos secundarios (quinonas y flavonoides) que generan efecto antimicótico, <i>in vitro</i> .	El efecto antimicótico <i>in vitro</i> en cepas de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	Tamaño del Halo de inhibición (mm)	Experimental Transversal	
2. ¿Presentará el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) un grado de concentración óptimo que genere efecto antimicótico frente a cepas <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188?	2. Determinar el grado de concentración óptimo del extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) que genere efecto antimicótico frente a cepas <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	2. Sí presenta el extracto hidroalcohólico de la inflorescencia de <i>Rumex crispus</i> (lengua de vaca) un grado de concentración óptimo que genera efecto antimicótico frente a cepas <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.			DISEÑO	
					Experimental.	