

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE, HEMOSTÁTICA Y TOXICIDAD AGUDA POR VIA ORAL Y TÓPICA DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Castilleja pumila* (misk'icha).

TESIS PRESENTADA POR:

Br. SHIRLEY CRUZKAYNA MENDOZA ALVAREZ

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO.

ASESOR:

Dr. NERIO GONGORA AMAUT.

CO-ASESORA:

Mgt. YANET CUENTAS ROMAÑA.

CUSCO - PERÚ

2019

AUSPICIO: PROYECTO ARES

DEDICATORIA

Mi más profundo agradecimiento primeramente a Dios, quien ha guiado mi camino.

A mis padres y familiares por el apoyo constante e incondicional en el logro de uno de mis objetivos en mi vida.

A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, a la Facultad de Ciencias de la Salud, La Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, en cuyas aulas me forme profesionalmente.

A los docentes que con su experiencia y conocimiento motivaron mis ideales, a mis compañeras y grandes amigas que me dieron su apoyo en todo momento, y en general a todas las personas que han contribuido en esta investigación y hacer posible el logro de este reto, anhelo; personal y profesional.

Agradecer de manera especial y sincera a mis dictaminantes por la paciencia y tiempo brindado durante toda la etapa de revisión.

AGRADECIMIENTO

A toda mi familia, principalmente a mi madre Ysabel, por su apoyo y comprensión, a mi padre Ronald, por su apoyo y sus consejos; también a mis abuelitos Inocencia y Erasmo por sus palabras de aliento en cada momento. A ustedes, por aguantar mis malos ratos de estrés y hacerme sonreír.

A Yusara, por su atención, aliento y apoyo siempre y en todo momento, desde el inicio, durante y después del trabajo. A mis amigas Hilda, Amelia, Ruth Linda y Myrian por su apoyo y compromiso en siempre estar dispuestas a ayudarme; a todas ustedes gracias por su buen humor, amistad y alegría; así como por todos los buenos recuerdos generados en este tiempo compartido y por las palabras de aliento que me han regalado siempre.

A mis docentes de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, Dr. Nerio Gongora, Mgt. Yanet Cuentas, Mgt. Zany Triveño, Mgt. Carlos Chalco y Dra. Carla del Carpio, por toda su ayuda, sus recomendaciones y sus palabras de aliento.

A Sor Esther y Sor Zulma, quienes siempre han estado pendientes de mi avance en el trabajo; regalándome regaños, enojos y sobre todo palabras de aliento, paciencia y comprensión en todo momento y porque siempre me han abierto las puertas de su casa con cariño.

Al Laboratorio de Investigación, así mismo al Laboratorio de Ciencias Básicas, dirigido por la Mgt. Anahí Cardona; por prestarme las instalaciones para llevar a cabo el proceso de experimentación; así también al convenio ARES por proporcionar los fondos de donde deriva el presente trabajo.

A todos quienes han creído en mí, que me han dado palabras de aliento en los momentos que sentí flaquear, a los que han compartido conmigo. Muchas Gracias.

CONTENIDO

1	CAPÍTULO I.....	1
1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.3	OBJETIVOS	4
1.3.1	Objetivo general.....	4
1.3.2	Objetivos específicos.....	4
1.4	JUSTIFICACION E IMPORTANCIA.....	4
1.5	LIMITACIONES.....	5
1.6	HIPÓTESIS	5
2	CAPÍTULO II.....	6
2.1	ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	6
2.2	ANTECEDENTES	7
2.2.1	Antecedentes Etnobotánicos	7
2.2.2	Antecedentes de Estudios de Coagulación	10
2.3	BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	13
2.3.1	Aspectos botánicos de la planta en estudio.....	13
2.3.2	Hemostasia.....	15
2.3.3	Ácido Tranexámico	32
2.3.4	Determinación de la Toxicidad Aguda.	34
2.3.5	Determinación de la Cantidad de personas para realizar las pruebas In Vitro.....	39
2.4	DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	40
	CAPÍTULO III	41
3.1	Materiales.....	41
3.1.1	Material Biológico.	41

3.1.2	Materiales e Instrumentos de Laboratorio.	41
3.2	Diseño Metodológico.....	43
3.2.1	Tipo de Investigación.....	43
3.2.2	Determinación de la Cantidad de personas para realizar la prueba de Tiempo de Coagulación y Tiempo de Protrombina.	43
3.2.3	Diseño de la Investigación.....	45
3.3	Identificación y Operacionalización de Variables.	51
3.3.1	Variables Implicadas.....	51
3.3.2	Variables No Implicadas.	55
3.4	Criterios de Inclusión y Exclusión.....	58
3.5	Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.	59
3.6	Técnicas para el Procesamiento y Análisis de Datos.....	59
3.7	Procedimientos.	60
3.7.1	Descripción de los Procedimientos.....	61
4	CAPÍTULO IV	83
4.1	Ensayos Preliminares.....	83
4.1.1	Determinación de Porcentaje de Humedad de la planta <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha”.....	83
4.1.2	Determinación de Porcentaje de Rendimiento del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha”.....	84
4.1.3	Pruebas de Solubilidad del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha”.....	85
4.1.4	Determinación del Análisis Fitoquímico Cualitativo del extracto seco hidroalcohólico al 70% <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha”.....	86
4.2	Prueba de la Actividad Coagulante In Vitro.....	88
4.2.1	Evaluación del Tiempo de Coagulación por el Método de White- Modificado.	88

4.2.2	Evaluación del Tiempo de Protrombina en plasma por el Método de Quick-Modificado.	94
4.3	Prueba de la Actividad Hemostática In Vivo.....	101
4.4	Pruebas de Toxicidad.....	109
4.4.1	Evaluación de la Toxicidad Oral del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha” al 70% en ratones de experimentación.....	109
4.4.2	Evaluación de la Toxicidad Dérmica del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha” al 70% en ratones de experimentación.....	113
	CONCLUSIONES.....	115
	RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	117
	BIBLIOGRAFIA.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1:	Resumen de Operacionalización de Variables Implicadas.....	57
TABLA N° 2:	Resumen de Operacionalización de Variables no Implicadas.....	58
TABLA N° 3:	Distribución de los sujetos de experimentación en grupos y concentración del extracto a probar	68
TABLA N° 4:	Distribución de los sujetos de experimentación en grupos y concentración del extracto a probar.....	72
TABLA N° 5:	Distribución de los sujetos de experimentación en grupos y concentración del extracto a probar.....	75
TABLA N° 6:	Distribución de los sujetos de experimentación en grupos y concentración del extracto a probar.....	78
TABLA N° 7:	Porcentaje de humedad de la planta <i>Castilleja pumila</i> (miskicha).....	84
TABLA N° 8:	Porcentaje de rendimiento del extracto seco hidroalcohólico al 70% de <i>Castilleja pumila</i> (misk’icha).....	85
TABLA N° 9:	Solubilidad del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk’icha) al 70%.....	86

TABLA N° 10: Análisis fitoquímico cualitativo del extracto seco hidroalcohólico al de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70%.....	87
TABLA N° 11: Resultados de la Evaluación de la actividad coagulante in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> “misk'icha” al 70% en muestras de sangre venosa.....	89
TABLA N° 12: Disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de sangre.....	90
TABLA N° 13: Porcentaje de disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de sangre.....	92
TABLA N° 14: Análisis de varianza de la disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de sangre.....	94
TABLA N° 15: Resultados de la evaluación de la actividad del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> “misk'icha” al 70% en plasma.....	95
TABLA N° 16: Resultados de la evaluación de la actividad del tiempo de protrombina desarrollados en valores de INR.....	96
TABLA N° 17: Disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de plasma.....	96
TABLA N° 18: Porcentaje de disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de plasma.....	98
TABLA N° 19: Análisis de varianza de la disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de plasma.....	100
TABLA N° 20: Resultados de la Evaluación de la actividad hemostática con la administración del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> “misk'icha” al 70% en ratones con heridas.....	102

TABLA N° 21: Disminución del tiempo de hemostasia in vivo con la administración del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en ratones con heridas.....	103
TABLA N° 22: Porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia in vivo con la administración del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en ratones con heridas.....	105
TABLA N° 23: Análisis de varianza de la disminución del tiempo de hemostasia in vivo con la administración del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en ratones con heridas.....	107
TABLA N° 24: Prueba de Duncan sobre la disminución del tiempo de hemostasia in vivo con la administración del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en ratones con heridas.....	108
TABLA N° 25: Observación de la fase I de la prueba de toxicidad por vía oral en ratones del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70%.....	110
TABLA N° 26: Observación de la fase II de la prueba de toxicidad por vía oral en ratones del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70%.....	112
TABLA N° 27: Observación del ensayo de irritación dérmica aguda en ratones con el extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70%.....	114

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURA N° 1: Planta de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	15
FIGURA N° 2: Fases de la Hemostasia.....	20
FIGURA N° 3: Fase vascular y Fase plaquetaria.....	20
FIGURA N° 4: Coagulación.....	23
FIGURA N° 5: Mecanismo de Coagulación de la sangre.....	24
FIGURA N° 6: Vía Intrínseca de la Coagulación.....	27
FIGURA N° 7: Vía Extrínseca de la Coagulación.....	29
FIGURA N° 8: Cascada de Coagulación.....	31

ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

FLUJOGRAMA N° 1: Flujograma de la investigación.....	61
FLUJOGRAMA N° 2: Procedimiento de la determinación de la actividad coagulante.....	69
FLUJOGRAMA N° 3: Procedimiento de la determinación del tiempo de protrombina.....	73
FLUJOGRAMA N° 4: Procedimiento de la determinación de la actividad hemostática.....	76
FLUJOGRAMA N° 5: Procedimiento de la determinación de la toxicidad aguda tóxica.....	80
FLUJOGRAMA N° 6: Procedimiento de la determinación de la toxicidad oral.....	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1: Disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de sangre.....	90
GRÁFICO N° 2: Porcentaje de disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de sangre.....	92
GRÁFICO N° 3: Disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de plasma.....	97
GRÁFICO N° 4: Porcentaje de disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en muestras de plasma.....	99
GRÁFICO N° 5: Disminución del tiempo de hemostasia in vivo con la administración del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en ratones con heridas.....	103
GRÁFICO N° 6: Porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia in vivo con la administración del extracto seco hidroalcohólico de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha) al 70% en ratones con heridas.....	105

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.....	126
ANEXO N° 2: CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (RATONES ALBINOS).....	127
ANEXO N° 3: PRUEBAS DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO.....	128
ANEXO N° 4: GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATÓN – INSTITUTO NACIONAL DE SALUD.....	131
ANEXO N° 5: ENCUESTA – TEST DE SELECCIÓN DE PERSONAS PARA REALIZAR EL ESTUDIO DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE Y HEMOSTÁTICA.....	134
ANEXO N° 6: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	135
ANEXO N° 7: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	136
ANEXO N° 8: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LA EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	137
ANEXO N° 9: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LA EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	138
ANEXO N° 10: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LA EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE HEMOSTASIA DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	139
ANEXO N° 11: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LAS OBSERVACIONES REALIZADAS EN LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TÓPICA POR IRRITACIÓN PRIMARIA DE LA PIEL DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	140

ANEXO N° 12: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LAS OBSERVACIONES REALIZADAS EN LA PRUEBA DE TOXICIDAD POR VIA ORAL DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha).....	141
ANEXO N° 13: ARCHIVO FOTOGRÁFICO.....	142

RESUMEN

El trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de demostrar la actividad coagulante, tiempo de protrombina y la actividad hemostática del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* (misk'icha).”, en muestras de sangre venosa y en heridas producidas en ratones; respectivamente; así como la evaluación de la toxicidad aguda por vía oral y dérmica.

A partir del extracto hidroalcohólico al 70%, el análisis fitoquímico cualitativo mostró la presencia en mayor cantidad de flavonoides y quinonas; así mismo se realizó el estudio de la solubilidad del extracto.

La determinación del tiempo de coagulación, por el método de White y el tiempo de protrombina, por el método de Quick; se utilizaron muestras de sangre humana de 10 voluntarios, las muestras fueron divididas en tres para trabajar las tres dosis diferentes (C1=0.01mg/mL), (C2=0.1mg/mL), (C3=1mg/mL); del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* (misk'icha).”, obteniéndose un porcentaje de disminución del tiempo de coagulación del 15.67%, para la dosis 3 (C3=1mg/mL), por lo que se puede concluir que esta dosis es la más efectiva; y un porcentaje de disminución del tiempo de protrombina del 44%, para la dosis 3 (C3=1mg/mL), por lo que se puede concluir que esta dosis es la más efectiva.

Para la determinación de la actividad hemostática se realizó aplicando el método de sangría de Ivy Modificado, para lo cual se utilizaron 50 ratones albinos *Mus musculus*, a los cuales se les realizó cortes con el propósito de producir una hemorragia considerable, administrándoles las dosis respectivas; (C1=10mg/kg), (C2=100mg/kg), (C3=1000mg/kg); obteniéndose un porcentaje del tiempo de disminución de hemostasia del 10.34%, con la dosis 3 (C3=1000mg/kg) de donde concluimos que esta es la dosis más efectiva.

Mediante el criterio de Draize (69) para la determinación de toxicidad aguda por irritación dérmica; y la prueba de toxicidad aguda por vía oral bajo el criterio de Lorke del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* (misk'icha), según la metodología planteada se tuvo en observación a los animales, y durante este tiempo no hubo presencia significativa, es decir cambios morfológicos representativos, irritación, en la piel de los animales, determinando así que bajo esta prueba se

produce una toxicidad tóxica en un grado mínimo, de cero a cuatro. Tampoco hubo presencia significativa en cuanto a los signos (diarrea, temblores, somnolencia) y síntomas (irritabilidad, agresividad, depresión) en los animales, ni se produjo la muerte de ninguno de ellos, por lo tanto, se determinó que a las dosis evaluadas el extracto no presenta toxicidad aguda por vía oral.

En conclusión, el presente estudio brinda evidencia científica de *Castilleja pumila* para el tratamiento de hemorragias, presenta leve a moderada toxicidad oral y dérmica.

Palabras claves: *Castilleja pumila*, extracto seco, coagulación, protrombina, hemostasia.

ABSTRACT

The research work was carried out with the objective of demonstrating the coagulant activity, prothrombin time and the hemostatic activity of the 70% hydroalcoholic dry extract of *Castilleja pumila* (misk'icha).”, In samples of venous blood and wounds produced in mice; respectively; as well as the evaluation of acute toxicity orally and dermally.

From the 70% hydroalcoholic extract, the qualitative phytochemical analysis showed the presence in a greater amount of flavonoids and quinones; Likewise, the study of the solubility of the extract was carried out.

The determination of the coagulation time, by the White method and the prothrombin time, by the Quick method; human blood samples from 10 volunteers were used, the samples were divided into three to work the three different doses (C1 = 0.01mg / mL), (C2 = 0.1mg / mL), (C3 = 1mg / mL); of the dry extract hydroalcoholic to 70% of *Castilleja pumila* (misk'icha). ”, obtaining a percentage of reduction of the coagulation time of 15.67%, for the dose 3 (C3 = 1mg / mL), so it can be concluded that this dose is the most effective; and a percentage of prothrombin time decrease of 44%, for dose 3 (C3 = 1mg / mL), so it can be concluded that this dose is the most effective.

For the determination of hemostatic activity, the modified Ivy bleeding method was applied, for which 50 *Mus musculus* albino mice were used, to which cuts were made with the purpose of producing a considerable hemorrhage, administering the respective doses; (C1 = 10mg / kg), (C2 = 100mg / kg), (C3 = 1000mg / kg); obtaining a percentage of the time of decrease of hemostasis of 10.34%, with dose 3 (C3 = 1000mg / kg) where we conclude that this is the most effective dose.

through the Draize criterion (69) for the determination of acute toxicity due to dermal irritation; and the acute oral toxicity test under Lorke's criteria of 70% hydroalcoholic dry extract of *Castilleja pumila* (misk'icha), according to the methodology proposed, the animals were observed, and during this time there was no significant presence , ie representative morphological changes, irritation, in the skin of the animals, thus determining that under this test a topical toxicity occurs to a minimum degree, from zero to four. Nor was there a significant presence in terms of signs (diarrhea, tremor,

drowsiness) and symptoms (irritability, aggressiveness, depression) in animals, nor did any of them die, therefore, it was determined that at the doses evaluated the extract does not present acute oral toxicity.

In conclusion, the present study provides scientific evidence of *Castilleja pumila* for the treatment of hemorrhages, presents mild to moderate oral and dermal toxicity.

Key words: *Castilleja pumila*, dry extract, coagulation, prothrombin, hemostasis.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos pasados el hombre ha buscado solución a sus enfermedades y afecciones, utilizando la flora y fauna de su entorno, y por ello al ir experimentando con diferentes sustancias que la naturaleza le proveía, este conocimiento fue pasando de generación en generación hasta nuestros tiempos. En un 80 por ciento de los casos hay una concordancia entre lo que dice la tradición y el estudio fitoquímico. Las propiedades de las plantas son conocidas por el mundo científico, por eso hay un porcentaje importantísimo de remedios alopáticos y homeopáticos que se elaboran con ellas. Según la OMS, el 80 por ciento de la población mundial consume hierbas medicinales para tratar algún tipo de afección. (1)

Se sabe que los antiguos peruanos utilizaban plantas no solo como alimento, también las empleaban para curar males que los aquejaban. Existen informaciones bibliográficas y folklóricas en las que se dan a conocer el empleo de las plantas para estos fines. Se sabe que las plantas medicinales fueron la base para diversos tratamientos y diversos fármacos tienen su origen en plantas medicinales, en los que la ciencia y la tecnología han tenido un avance sorprendente, motivo por el cual la ciencia nos ayuda a investigar sobre las diferentes propiedades que se les atribuye a las diferentes especies. (2)

Según el estudio Etnobotánico realizado por Rado J. B. 2011; quien redacta sobre dicha especie vegetal, *Castilleja pumila (Benth) Weed*. "Misk'icha", y sus propiedades en el trabajo de tesis "Etnobotánica del Distrito de Ocongote - Cusco"; que los usos que se le atribuye a esta especie vegetal son como infusión de toda la planta para aliviar hemorragias, y utilizado también como parches; sobre heridas y raspones, lo que permite actuar como cicatrizante y hemostático. (3)

El Perú posee recursos naturales con actividad terapéutica, los cuales existen en los reportes etnobotánicos de plantas medicinales, alguno de ellos usados en procesos de hemorragia; este es el caso de *Castilleja pumila (Benth) Weed*. "Misk'icha" es una especie vegetal nativa perteneciente a la familia de las Orobanchaceae y cuyo nombre común es de origen quechua, dentro del

Departamento del Cusco, y cuyas características intrínsecas de la especie ayudan a su reconocimiento dentro de la flora regional.

En el presente estudio se evalúa la actividad coagulante y hemostática; así como la toxicidad aguda por vía oral y tópica del extracto seco hidroalcohólico de toda la planta de *Castilleja pumila* (Benth) Weed. "Misk'icha"; por lo tanto, tiene el objeto de validar científicamente el uso terapéutico de *Castilleja pumila* (Benth) Weed. "Misk'icha" sobre la Coagulación.

ABREVIATURAS

TP	: Tiempo de Protrombina
GP	: Glicoproteínas
FVW	: Factor de Von Willebrand
FDC	: Factor de crecimiento de plaquetas
FT	: Factor Tisular
FXa	: Factor X activado
GLA	: Acido B-glutamil carboxilo
TAFI	: Inhibidor de la Fibrinólisis activado por trombina
t-PA	: Activador tisular del plasminógeno
PAI	: Inhibidor del Activador del Plasminógeno
ECV	: Enfermedades cardiovasculares
TNF	: Factor de Necrosis Tumoral
cm	: centímetros
cm ²	: centímetros cuadrados
µl	: microlitros
g	: gramo
mg	: miligramo
kg	: kilogramo
mL	: mililitro

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los usos de las plantas en diferentes áreas de nuestra cultura han determinado y conformado las bases de nuestra identidad. Nos han sanado y lo más importante, aportado el oxígeno para la supervivencia de nuestra especie y la vida en el planeta. Existen pruebas empíricas y científicas que avalan los beneficios de diversas plantas medicinales en diversas afecciones crónicas o leves. Los tratamientos con plantas medicinales, son la forma más popular de medicina tradicional, perdurando a lo largo del tiempo gracias a la transmisión oral. (4)

En la actualidad la búsqueda por encontrar nuevas sustancias con actividades terapéuticas ha llevado a los investigadores a profundizar los estudios sobre la composición y uso de los principios activos de diversas plantas medicinales que son muy poco conocidas y que sin embargo poseen actividades farmacológicas interesantes y de gran aporte a la salud. (4)

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. (5)

Los factores determinantes de la salud son, ante todo, de carácter socio-cultural, económico, ambiental y político, por lo tanto, es necesario enfocar la problemática general de salud desde una perspectiva más integral e intercultural. La medicina tradicional justamente es integral y, por lo tanto, presenta una visión adecuada a los problemas de salud. El empleo de diferentes especies vegetales, en el tratamiento de algunos procesos patológicos, es una práctica que aumenta cada día, constituyendo lo que se ha llamado la medicina alternativa. Esto es debido a que,

en los últimos años, se ha intensificado la investigación fitoquímica que ha permitido identificar y aislar los principios activos responsables de la actividad farmacológica, dando lugar a que puedan ser presentados en variadas formas de dosificación. (6)

De la recolección de información, en cuanto a enfermedades de trastornos metabólicos; se evidencia que la existencia en los severos cambios metabólicos que se dan en la Diabetes Mellitus II parecen influenciar la coagulación y la función plaquetaria. Estudios realizados en plaquetas y coagulación sanguínea han permitido asegurar que estos trastornos son posiblemente un factor importante en el estado pretrombótico que presentan estos enfermos. (7)

Informes como los de Planken y colaboradores y Sandoval D. y colaboradores han documentado la existencia de porcentajes no significativos de los valores alterados del recuento plaquetario y del volumen plaquetario medio con respecto a los controles diarios y los valores de referencia. (7) (8). Por otra parte, Papanas y colaboradores muestran resultados opuestos a los anteriores, en los que las alteraciones en el volumen plaquetario medio se presentan de forma significativa en pacientes con Diabetes Mellitus II. (9)

Según el informe publicado por Novo Nordisk, hay 420.000 personas en el mundo que sufren de Hemofilia. Mientras que, en Colombia, las cifras de hemofílicos superan los 1.900 diagnosticados. 76% tipo A, 16% tipo B y alrededor del 8% no está clasificado por tipo, de acuerdo con el más reciente reporte de la Federación Mundial de Hemofilia (WEH). Para entender en qué consiste esta clasificación, el doctor Juan Gabriel Cendales, Director Médico de Novo Nordisk, explica que existen distintos factores numerados que intervienen en la coagulación, “cada uno cumple funciones específicas en la sangre. Cuando el factor VIII está afectado, el paciente es diagnosticado con Hemofilia A en el caso del factor IX la calificación es de tipo B”. Entre las características de la enfermedad para las dos clases de hemofilia se cuenta la aparición de hemorragias articulares, estas pueden presentarse en las rodillas o los codos de los pacientes lo que limita su capacidad para realizar actividades normales. (10)

Según información de la Sociedad Peruana de Hematología, en el Perú sólo el 25% de los pacientes tiene diagnosticada la hemofilia y el porcentaje restante aún desconoce que la sufre o lo que es peor, no ha recibido el diagnóstico respectivo. Se calcula que hay entre 2,500 y 3,000 peruanos con hemofilia, de las cuales 950 están diagnosticadas con esta enfermedad. (11)

En el Perú la Diabetes Mellitus afecta al 7% de la población (más de 2 millones de personas) y sólo 3,2% de los casos son Diabetes Mellitus tipo I. La Costa presentó una prevalencia de 8,2%, la Sierra 4,5% y la Selva 3,5%. En Cusco la prevalencia en el año 2016 fue 4,9% con 573 casos registrados (MINSa, 2017). Un determinante importante en la epidemiología de la diabetes es la condición socioeconómica de los pacientes debido a que es más prevalente en los sectores más vulnerables de la población. (12). En la actualidad la mayoría de los autores coinciden en que en la Diabetes Mellitus existen alteraciones en el mecanismo de la hemostasia que propician el establecimiento de un estado de hipercoagulabilidad, lo que contribuye al desarrollo de manifestaciones trombóticas en estos pacientes. (7) (13)

La especie vegetal *Castilleja pumila* “*misk'icha*”, actualmente no cuenta con un estudio fitoquímico, farmacológico ni toxicológico que avale las propiedades coagulantes y hemostáticas que le atribuye la medicina tradicional.

Teniendo como únicos antecedentes los usos tradicionales que se le atribuyen a esta planta, en algunos casos para el tratamiento de hemorragias, se busca comprobar la actividad coagulante y hemostática de esta planta, así como determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios mediante pruebas fitoquímicas de identificación cualitativa dando una base científica para su utilización adecuada y de esta manera dar un aporte en cuanto a la validación del conocimiento tradicional.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará actividad coagulante, hemostática y toxicidad aguda por vía oral y toxicidad dérmica por vía tópica, el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “*misk'icha*”?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad coagulante, hemostática y toxicidad aguda por vía oral y tópica del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* (misk'icha)."

1.3.2 Objetivos específicos

1. Realizar las pruebas preliminares de solubilidad, análisis fitoquímico cualitativo del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha".
2. Evaluar la disminución del tiempo de coagulación y el tiempo de protrombina in vitro, en muestras de sangre venosa humana, del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha".
3. Determinar la actividad hemostática del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha" en heridas producidas en ratones albinos *Mus musculus*.
4. Evaluar la toxicidad aguda por vía oral del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha", por el método de Lorke, en ratones albinos *Mus musculus*.
5. Evaluar la toxicidad aguda por vía tópica del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha", mediante el criterio de Draize, en ratones albinos *Mus musculus*.
6. Comparar la actividad hemostática del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha" in vivo frente al ácido Tranexámico.

1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

En nuestra región se presentan diferentes ecosistemas en los que se desarrollan una gran variedad de plantas, variedad que a su vez se manifiesta en las múltiples aplicaciones tradicionales y terapéuticas conocidas. (14) Esta diversidad origina la necesidad de recabar información por zonas, aun tratándose de especies con el

mismo nombre, pues en el ámbito local existe escasa información respecto de plantas medicinales de determinadas localidades. (15)

El estudio de la actividad coagulante y hemostática de *Castilleja pumila* “misk’icha”, dando como respuesta el inicio de la hemostasia, que es el fenómeno fisiológico que detiene el sangrado y, a su vez, un mecanismo de defensa que, junto con la respuesta inflamatoria y de reparación, ayuda a proteger la integridad del sistema vascular después de una lesión tisular; así como en la aplicación de la disminución del tiempo de coagulación, teniendo como propósito hacer una revisión de las propiedades biológicas que ofrecen los compuestos activos de *Castilleja pumila* “misk’icha”, además de corroborar en la investigación el efecto que posee esta especie, siendo aún más importante que la planta de estudio crece en el Cusco.

La existencia de plantas con potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés para el tratamiento de diversas enfermedades, de ahí la importancia y necesidad de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración. (16)

Así mismo el ampliar las investigaciones en plantas medicinales de nuestra región las cuales se llevan a cabo en la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de nuestra universidad plasmada en los diversos temas de tesis existentes; su finalidad es también desarrollar nuestros recursos naturales ya que contamos con diversas especies vegetales las cuales tienen diversos efectos aún más por comprobar.

1.5 LIMITACIONES

No se encontró suficiente material bibliográfico sobre estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados acerca de la especie *Castilleja pumila* (misk’icha), su literatura es limitada.

1.6 HIPÓTESIS

- El extracto seco hidroalcohólico al 70% de la planta de *Castilleja pumila* “misk’icha”, presenta actividad coagulante y hemostática, con ausencia de toxicidad aguda por vía oral y tópica en animales de experimentación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 ESTADO DE LA CUESTIÓN

El conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas está basado en la observación, la experiencia y el conocimiento profundo de la población; el cual es transmitido de generación en generación. Estos conocimientos, deben contribuir a resolver, en parte, los problemas de salud de la población menos favorecida y más alejada, cuyas posibilidades de curarse son, actualmente, limitadas; ya sea por el alto costo de los medicamentos, la distancia a la que se encuentran los centros de salud, o por el hecho de arraigarse a sus propios conocimientos en la resolución de los diversos problemas de salud.

Siendo así que al realizar una revisión de los procedimientos actuales para el tratamiento de la hemorragia se plantea una alternativa que sirva de base para actualizar los protocolos de intervención ante este tipo de incidentes, que se orienta a mejorar el procedimiento y la intervención en este tipo de casos mediante el empleo de plantas medicinales que favorecen la hemostasia y la coagulación.

El presente estudio tiene como objetivo proporcionar una alternativa hemostática local en el manejo de personas con riesgo a una hemorragia; el sangrado es un motivo de consulta habitual; el 25% de los hombres y el 46% de las mujeres normales refieren, al menos, un síntoma de sangrado. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de mortalidad en el mundo. En el Perú, en el año 2012 las enfermedades isquémicas del corazón y las cerebrovasculares ocuparon la quinta y sétima causas de muerte respectivamente, con más de 8 mil casos anuales. (17)

Al realizar la investigación del presente tema, se pudo observar que no hay estudios referentes a la planta *Castilleja pumila* “misk’icha”, habiendo buscado información en diferentes medios, como libros, tesis, artículos científicos, artículos botánicos.

Por tanto, esta es una planta relativamente nueva en la investigación, ya que no se han reportado estudios en lo referente a su composición fitoquímica, por lo que es

conveniente realizarlo para conocer sus componentes y la propiedad coagulante que le confiere la medicina tradicional; encontrándose estudios botánicos y etnobotánicos. Así mismo es un tema que busca aportar un conocimiento en el campo fitoquímico y validar científicamente si presenta o no la actividad que se le atribuye. Es así que resulta de suma importancia la realización de un estudio que recopile los conocimientos acerca de esta planta medicinal, puesto que ello ayudará a que puedan ser estudiadas científicamente en todos sus aspectos.

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 Antecedentes Etnobotánicos

- **Rado J. B.: “Etnobotánica del Distrito de Ocongate-Cusco”. UNSAAC Facultad de Ciencias Biológicas - Tesis 2011. (3)**

Objetivo: Valorar las diferentes especies Etnobotánicas existentes en las comunidades de Ocongate. La valorización de estas colectas está en que estos ejemplares del herbario son el registro permanente de las plantas conocidas por una determinada comunidad. Además, sirven como ejemplares, permitiendo a los taxónomos determinar la familia, género y especie de la colecta. Es una amplia gama de información que se obtiene acerca de cómo se relaciona la gente local con el medio ambiente natural. **Materiales y Métodos:** La forma de recopilar información se da mediante el conversar con la gente, observar lo que ésta hace y participar en sus actividades cotidianas. Aunque estas actividades etnográficas parecen tan naturales que pudieran considerarse obvias. Se requiere de gran capacidad de escucha y observación. **Resultados y conclusiones:** *Castilleja pumila (Benth.) Wedd.*; Cespitoso en floración y fructificación con flores rojas con líneas amarillas; los frutos en cápsula septicida, estilos con néctar dulce en la base, razón por lo que le gusta al ganado; Nombre Local: Miskicha o Pampa-Lacre; Grupo Etnobotánico: Medicinal y Forrajero; Usos: La infusión de toda la planta se utiliza para aliviar hemorragias. También es utilizada aplicando las hojas como pequeños parches sobre heridas y raspones, esto le permite actuar como cicatrizante y hemostático.

- **Fundación SUYANA - PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO INTEGRAL DE COMUNIDADES RURALES EN EXTREMA POBREZA “MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PASTURAS NATURALES ALTOANDINAS” 2da. Edición La Paz, Bolivia Julio de 2011. (18)**

Objetivo: Mejorar la calidad de vida de las familias que conforman comunidades rurales que viene ejecutando el Programa de Fortalecimiento Integral de Comunidades Rurales en Extrema Pobreza; con el afán de lograr una mayor productividad. **Materiales y Métodos:** Como complemento a las campañas de sanidad animal y de las capacitaciones impartidas a los criadores de camélidos, presentamos este manual. **Resultados y Conclusiones:** *Castilleja pumila (Benth.) Wedd. Ex Herrera*, Raíz poco ramificado, tallo Herbáceo de 4-5 cm de altura, hojas partidas en la parte apical con segmentos lineales, el margen oscuro y ciliado, flores de corola tubulosa guinda, pubescente, de 1.5 cm de largo; fruto abayado; hábitat de lugares con gran cantidad de humedad, Importancia y Uso: La flor presenta néctar en el tubo floral en épocas de lluvia. Tiene como nombre común “frutillo”.

- **Fernández Pardo. F.: “La Flora Local como Estrategia para Reducir Riesgos Climáticos desde un Enfoque Etnoecológico; Caso Comunidad Challoma (prov. Capacarí) del Departamento de Cochabamba” Universidad Mayor de San Simón Facultad de Ciencias y Tecnología – 2014. (19)**

Las estrategias campesinas en la zona alto-andina de Cochabamba, están dirigidas a minimizar el riesgo por amenazas climáticas a través del saber local y el manejo adecuado de sus recursos localmente disponibles. **Objetivo:** El presente trabajo recoge los resultados de la investigación sobre los usos y funciones de la flora local de Challoma, como una estrategia en la reducción de riesgos climáticos. Esta investigación se realizó desde octubre del 2010 a octubre del 2011. **Materiales y Métodos:** El estudio se basó en la revalorización de aquellas prácticas y conocimientos de tres familias escogidas como estudio de caso, complementada con información de talleres comunales que se realizaron durante la ejecución del Proyecto de Gestión de Riesgos Agrícolas Comunales “GRAC”. De esta forma se llegaron a identificar 100 plantas útiles para la comunidad de Challoma, de las cuales 79 de ellas como medicina tradicional, 32 como forraje, 29 como combustible,

25 como bioindicadores, 20 en la construcción, 17 en la conservación de suelos, 16 en alimento, 12 de uso cultural, 11 como biofoliares y 4 en colorantes o tintes.

Resultados y Conclusiones: De las Plantas usadas como alimento; este uso se refiere a una alternativa de alimento para el humano, como los frutos, hojas, flores, raíces y todo lo que se pueda consumir. En la comunidad de Challoma se aprovecha incluso el néctar de algunas flores como fuente energética durante el trabajo o como dulce para los niños, también utilizan otras sustancias o fluidos de algunas plantas como el chicle andino o el Qawi qawi (*Paranephelius ovatus*), que contiene un látex blanco en la raíz y sirve como masticable. Por otro lado, están las plantas comestibles por sus hojas, tallos, raíces y frutos. *Castilleja pumila* (Miski); hierba bianual con hojas partidas en la parte apical y en roseta basal, florece de diciembre a abril, crece en praderas permanentemente húmedas en la zona agroecológica de altura. Usos y/o funciones: Como alimento se utiliza la flor. Se chupa el néctar como energizante y dulce especialmente para los niños.

- **Sociedad Peruana de Derecho Ambiental (SPDA) Registro de Agro diversidad y saberes locales. (20)**

La Sociedad Peruana de Derecho Ambiental (SPDA), la Universidad Agraria de la Molina (UNALM), ANPE-Perú, entre otras organizaciones integrantes del proyecto Agroeco, presentan la web Registro de Agrobiodiversidad y Saberes Locales, **Objetivo:** Ofrecer una herramienta para generar, documentar y diseminar información y datos relevantes que contribuyan a la conservación y uso sostenible de los Agroecosistemas y sus componentes. **Materiales y Métodos:** La web se enfoca en tres grandes temas: “cultivos nativos y agrobiodiversidad”, “etnobotánica” y “normas legales”. La web se ha desarrollado como parte del Proyecto AGROECO, un esfuerzo por iniciar, revalorar y fortalecer la agroecología y pequeña agricultura en el Perú, especialmente en los Andes cusqueños y cajamarquinos. Además, se contó con los aportes especialmente de la UNALM, la Universidad de Columbia Británica (UBC) y la SPDA. **Resultados y Conclusiones:** *Castilleja pumila*; Tiene como nombre común Puka laqre laqre; los usos que se le atribuyen son para ayudar a dilatar durante el parto y para reponerse post parto; la forma de uso en mates.

2.2.2 Antecedentes de Estudios de Coagulación

- **Benavente Concha, F. “Efecto in vitro del látex de *Ficus insípida* sobre la cascada de la coagulación sanguínea” Revista Médica Herediana v.21 n.3 Lima jul. 2010. (21)**

Es necesario investigar drogas naturales nuevas que aporten principios farmacológicos activos para ser utilizadas como una alternativa terapéutica. Por tal motivo se planteó estudiar a *Ficus insípida*, cuyo látex ha sido usado como antihelmíntico, pero se investigó solo superficialmente su efecto anticoagulante *in vitro*. **Objetivo:** Comprobar el efecto anticoagulante *in vitro* y determinar la vía de la coagulación sobre la que actúa el látex de *Ficus insípida*. **Material y métodos:** Se obtuvo el látex de *Ficus insípida* y se prepararon diferentes concentraciones del mismo. Se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica de 5 donantes voluntarios, anticoagulándolas con citrato de sodio. Estas se mezclaron con las diluciones del látex, se centrifugaron y se extrajo el plasma. Posteriormente, se obtuvo un pool de plasma para cada concentración del látex y se procedió a determinar el Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa). **Resultados:** Se encontró que el látex de *Ficus insípida* prolongó el TP a una concentración mayor o igual a 0,03125% (V/V), y ambos, el TP y TTPa a una concentración mayor o igual a 0,15% (V/V). **Conclusiones:** Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que el látex de *Ficus insípida* posee un efecto anticoagulante *in vitro* dosis dependiente sobre la vía extrínseca de la coagulación sanguínea a una concentración igual o mayor a 0,03125% (V/V) y que a una concentración igual o mayor a 0,15% (V/V) posee un potente efecto anticoagulante sobre ambas vías de la coagulación.

- **Brazón J. “Aislamiento y caracterización de compuestos fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*” Universidad Central de Venezuela - Facultad de Ciencias - Escuela de Biología - Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela 2015. (22)**

El uso de plantas medicinales es una práctica llevada a cabo durante toda la historia humana, cuyo conocimiento, adquirido a través de la experiencia de muchas

generaciones, representa milenios de saber popular, cuando las únicas fuentes medicinales disponibles provenían del reino vegetal. En la medicina popular venezolana las mujeres en edad reproductiva que padecen de menorragia, desorden menstrual caracterizado por una pérdida de sangre de más de 100 mL por ciclo o un sangrado continuo por más de 7 días; ingieren infusiones de flores de “rosa de montaña” o *Brownea macrophylla* para controlar la pérdida de sangre. Sin embargo, se ha encontrado que el extracto acuoso floral de esta planta, además de presentar componentes pro coagulantes también contiene componentes que degradan al fibrinógeno. **Objetivo:** Aislar y caracterizar componentes fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*. **Materiales y Métodos:** Se procedió a preparar el extracto acuoso floral de las inflorescencias, se evaluó mediante geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando el sistema Tris-Tricina (Schägger y Von Jagow 1987). Para tal fin 30 µg de fibrinógeno y diferentes cantidades (1; 5; 10; 20 y 30 µg) de extracto acuoso se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para la realización del Tiempo de Trombina, inicialmente se obtuvo plasma pobre en plaquetas (PPP) a partir de sangre humana, En un tubo de borosilicato (10 x 75 mm) se añadió 0,1 mL de tampón Tris-HCl (0,05 M/ NaCl 0,15 M a pH 7,4) y 0,1 mL de fibrinógeno humano al 0,3% en tampón imidazol salino (imidazol 0,05 M/NaCl 0,85%, pH 7,4) o plasma (PPP), sin tratar o tratado con el extracto o sus fracciones activas (20 µg), se mezcló bien y se incubó a 37 °C por 1 minuto. Posteriormente, se colocó 0,1 mL de trombina/Tris-HCl (2,5 IU/mL) y se midió el tiempo en segundos que tarda el coágulo en formarse, realizándose los ensayos por triplicado. **Resultados:** El extracto acuoso no coaguló fibrinógeno y por ende fue incapaz de formar la malla de fibrina. El extracto acuoso se fraccionó inicialmente por Sephadex G-50 (exclusión molecular) obteniendo 6 fracciones (S1 a S6) y la fracción con mayor actividad fibrinogenolítica fue S4. La actividad de esta fracción fue inhibida por EDTA, Benzamidina, PMSF y AIA, siendo este último el más eficiente. Luego, la fracción S4 se recromatografió a través de una columna IMAC-ZN Separopore (afinidad por metalo proteasas) obteniéndose dos fracciones S4A y S4B, donde S4A fue la más activa degradando fibrinógeno. **Conclusión:** Los compuestos fibrinogenolíticos

presente en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* no contribuyen a controlar la menorragia, si no que por el contrario podrían ser capaces de incrementar la pérdida de sangre, ya que el fibrinógeno degradado por el extracto, no es capaz de polimerizar en presencia de trombina para formar una malla de fibrina. Sin embargo, como la proporción de los componentes fibrinogenolíticos con respecto a los demás componentes presentes en el extracto es menor, es posible que no incremente la pérdida de sangre ya que, las mujeres que toman la infusión de flores de *Brownea macrophylla* no lo han reportado.

- **Díaz A, et al. “Efecto coagulante de dos variedades de hoja de coca en muestras de sangre de ratas albinas” Departamento Académico de Estomatología Biosocial, Facultad de Odontología. UNMSM, Lima 2007. (23)**
En esta investigación se evaluó el efecto coagulante de los extractos de dos variedades de hoja de coca: *Erythroxylum coca lam var. Coca* y *Erythroxylum novogranatense var. Truxillense*. **Objetivo:** Determinar el menor tiempo de coagulación de muestras de sangre de ratas albinas, tratadas con los extractos. **Materiales y Métodos:** Se seleccionó una muestra de 34 ratas, machos y hembras, a las cuales se le extrajeron 3 mL de sangre a cada una, colocando 1 mL de sangre en tubos que contenían 0.06 mL de suero fisiológico (grupo control), 0.06 mL de extracto de *E. coca lam var. Coca* (grupo coca), y 0.06 ml de extracto *E. novogranatense var. Truxillense* (grupo truxillense). **Resultados:** Los tiempos de coagulación de las muestras del grupo control fue de 1.42 min (± 0.31), el grupo coca obtuvo 1.38 min (± 0.26) y el grupo truxillense 1.83 min (± 0.55). Los promedios fueron comparados con Anova obteniendo diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.01$). **Conclusiones:** Se encontró que el grupo coca produjo el menor tiempo de coagulación que los otros dos grupos. El grupo truxillense mostró un efecto inhibitor de la coagulación comparado al grupo control.

- **Pastor S. “Evaluación del Efecto Coagulante de la Tela de la Araña *Scytodes longipes* Aplicada en Muestras de Sangre Humana” E.A.P. de Odontología; Facultad de Odontología; UNMSM, Lima 2015. (24)**

Tradicionalmente se ha reportado el uso de la tela de araña como hemostático. Países como España reportan bibliográficamente los remedios caseros hechos a base de esta tela. Inclusive algunos autores, mencionan su uso por los soldados en las batallas. **Objetivo:** Evaluar el efecto coagulante de la tela de la araña *Scytodes longipes* aplicados en muestras de sangre humana. **Materiales y Métodos:** La muestra de sangre fue obtenida de un paciente joven sano. La tela de araña fue producida por un grupo de arañas cazadas y criadas en semicautiverio durante 1 año. La tela se repartió en los grupos: Peso 1 (3-4 mg); Peso 2 (5-6 mg) y Peso 3 (7-8 mg) que fueron desinfectados y esterilizados. Se evaluó el efecto coagulante mediante la medición del Tiempo de Coagulación y el Tiempo de Protrombina. **Resultados:** La tela de la araña *Scytodes longipes* posee efecto coagulante mostrando una reducción significativa de Tiempo de Coagulación y Tiempo de Protrombina ($P < 0.05$). En cuanto a la comparación del efecto coagulante entre los grupos de peso, se encontró una diferencia que no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, en el Tiempo de Protrombina, se halló que, a mayor peso, el efecto coagulante mejora significativamente ($P < 0.05$). **Conclusiones:** El estudio determinó que la tela de la araña *Scytodes longipes* si posee efecto coagulante aplicado en muestras de sangre humana, ya que se presentó una reducción significativa en el tiempo de coagulación. El Tiempo de Protrombina en plasma con el uso de tela de la araña *Scytodes longipes* redujo significativamente el tiempo, encontrándose diferencia entre el grupo control y el grupo de peso (3-8 mg).

2.3 BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.3.1 Aspectos botánicos de la planta en estudio

2.3.1.1 Identificación Botánica de *Castilleja pumila* (misk'icha) por el Herbario Vargas CUZ (Anexo N°01)

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht

Orden: Lamiales Bromhead.

Superorden: Asteraneae Takht.

Familia: Orobanchaceae Vent.

Género: Castilleja Mutis ex L. f.

Especie: *Castilleja pumila*.

Nombre Científico: *Castilleja pumila* (Benth.) Wedd.

Nombre Común: Misk'icha.

2.3.1.2 Descripción Botánica

- ***Castilleja pumila*:**

Hierba o arbusto, holoparásito o hemiparásito de raíz, rara vez autótrofo. Tallos suculentos, herbáceos o leñosos. Hojas alternas u opuestas. Inflorescencias terminales, racemosas o espiciformes, bracteadas, ocasionalmente bractéoladas. Flores bisexuales, zigomorfas o actinomorfas, Frutos capsulares, semillas pequeñas, ovoidales, elipsoidales. (25) (Figura 1)



Figura 1. Planta de *Castilleja pumila*.

Fuente: Naturalista. (26)

2.3.1.3 Ecología de la Especie

- ***Castilleja pumila***

Los taxones endémicos se encuentran principalmente en las regiones Mesoandina y Páramo, entre los 2150 y 4600 m de altitud. Once taxones se encuentran representados dentro del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado. (27)

2.3.2 Hemostasia

2.3.2.1 Concepto.

En condiciones normales la sangre circula en fase líquida en todo el organismo. Después de una lesión vascular la sangre se coagula sólo en el sitio de la lesión para sellar únicamente el área lesionada. La transformación de sangre líquida en coagulo sólido está regulada por el sistema hemostático y depende de una interacción compleja entre la sangre (que contiene las células y los factores que intervienen en la coagulación) y pared vascular (el endotelio vascular tiene un papel fundamental dentro de la coagulación y la fibrinólisis, y en condiciones fisiológicas

tiene propiedades anticoagulantes, pero puede presentar propiedades procoagulantes cuando se rompe el equilibrio. (28)

La hemostasia es el fenómeno fisiológico que detiene el sangrado. Es un mecanismo de defensa que junto con la respuesta inflamatoria y de reparación ayudan a proteger la integridad del sistema vascular después de una lesión tisular. (28)

La hemostasia es el conjunto de mecanismos que permiten la prevención de la hemorragia espontánea y el control de la hemorragia traumática. (29)

El estímulo que desencadenará la activación de la hemostasia es la lesión a nivel del endotelio (que normalmente hace de barrera entre la circulación y el tejido a irrigar) provocando el contacto de la sangre con el tejido conectivo subendotelial. (28)

La respuesta hemostática incluye cuatro fases:

2.3.2.2 Fase Vascular o Vasoconstricción Refleja.

Tras la rotura de un vaso, se produce una vasoconstricción rápida y fugaz, que depende de la estimulación refleja de las terminaciones simpáticas que se encuentran entre la musculatura lisa de la pared vascular. (Figura 3) Esta constricción permitirá un cierto enlentecimiento de la circulación, facilitando así el siguiente paso de la hemostasia: la formación del trombo plaquetario. Cuando la lesión es capilar, la vasoconstricción refleja puede ser suficiente para que la hemorragia cese. En vasos mayores, este fenómeno es menos eficaz, y requiere prácticamente siempre de la acción ulterior de las plaquetas. La vasoconstricción refleja, de breve duración, es mantenida en muchos casos por una más duradera, ocasionada por la liberación de algunos mediadores como la adrenalina, la serotonina y el tromboxano A, desde las plaquetas que van adhiriéndose a la matriz sub endotelial o al tejido conjuntivo peri vascular. (30)

2.3.2.3 Fase Plaquetaria o Hemostasia Primaria.

Es el proceso de formación del tapón plaquetario iniciado ante una lesión vascular, llevándose a cabo una estrecha interacción entre el endotelio y la plaqueta. Normalmente las plaquetas no se adhieren al vaso sanguíneo; esto sólo ocurre cuando existe lesión en el vaso sanguíneo y se expone la colágena del subendotelio, permitiendo así la activación de las plaquetas. En la hemostasia primaria existe una serie de mecanismos que se desencadenan durante una lesión vascular y que permitirán la formación del tapón hemostático plaquetario. Dichos mecanismos se ordenan en las siguientes fases: 1) adhesión, 2) activación y secreción; y 3) agregación. (31) (Figura 2, Figura 3).

2.3.2.3.1 Adhesión de las Plaquetas.

Cuando ocurre una lesión en la pared de un vaso, quedan expuestos productos subendoteliales (por ejemplo, colágeno, FVW, fibronectina y laminina). El FVW facilita la adhesión inicial al unirse al complejo glicoproteínico (GP) Ib/IX/V, particularmente en presencia de fuertes fuerzas de cizallamiento. Estas interacciones permiten que la velocidad de circulación de las plaquetas disminuya lo suficiente para que tengan lugar otras interacciones de unión en otros pares receptor-ligando, lo que produce una adhesión estática. En particular, la interacción inicial entre colágeno y GPVI induce un cambio conformacional (activación) en las integrinas de las plaquetas GPIIb/IIIa y GPIa/IIa. El FVW y el colágeno forman sólidas uniones con GPIIb/IIIa y GPIa/IIa respectivamente, anclando a las plaquetas en su lugar. El reclutamiento de otras plaquetas ocurre por medio de una interacción plaqueta-plaqueta que es mediada principalmente a través del fibrinógeno y su receptor, GPIIb/IIIa. (32)

2.3.2.3.2 Activación de las Plaquetas.

La activación de la vía metabólica provoca la elevación del calcio citoplásmico y la fosforilación de proteínas de sustrato, lo cual genera cambios en el citoesqueleto, permitiendo el cambio de forma y la dispersión de las plaquetas, la liberación de contenidos granulares alfa y densos, la estimulación de la fosfolipasa A2 y la

liberación de TXA₂, la inducción de una superficie procoagulante, y la activación de los receptores GPIIb/IIIa. (32)

- **Cambios Morfológicos.**

La forma de las plaquetas cambia de un disco a una esfera puntiaguda con múltiples extensiones pseudopodiales. (32)

- **Alteraciones de la Membrana.**

La membrana plaquetaria se reacomoda, dejando expuestos fosfolípidos de carga negativa que facilitan la interacción con las proteínas de la coagulación para formar los complejos de tenasa y protrombinasa. (32)

- **Estimulación de la Síntesis.**

Conforme se reclutan las plaquetas hacia el área lesionada del vaso sanguíneo, éstas son activadas por una gama de agonistas entre los que se cuentan ADP, trombina y tromboxanos, los cuales interactúan con receptores transmembrana. La estimulación de los receptores da lugar a interacciones de proteína G que permiten la activación de enzimas que participan en vías metabólicas celulares, en particular la fosfatidilinositol 3-quinasa y la fosfolipasa C. (32)

- **Desgranulación.**

La desgranulación consiste en la liberación de numerosas citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz almacenadas en los gránulos alfa de las plaquetas. Estas sustancias fomentan una serie de mecanismos celulares y extracelulares importantes para la hemostasia, así como para otras etapas de la cicatrización de la herida: depósito de la matriz, quimiotaxis, proliferación celular, angiogenia y remodelación. (33)

El contenido de los gránulos plaquetarios es secretado a través del sistema canalicular conectado a la superficie, y ADP, fibrinógeno y factor V aparecen en la superficie de las plaquetas y en el medio inmediato que las rodea. Se secreta F₁DP₂, lo cual conduce a la proliferación de músculo liso. El factor 3 plaquetario también se expresa después de la activación plaquetaria. Pueden desprenderse pequeños

pedazos de la plaqueta para formar micropartículas circulantes. Las interacciones plaqueta–agonista dan lugar a la producción o liberación de diversas moléculas mensajeras intracelulares que facilitan estas reacciones. (32)

2.3.2.3.3 Agregación de las Plaquetas.

La presencia de plaquetas en el lugar de la lesión se estimula por el colágeno y la trombina expuestos. El colágeno del interior de la matriz subendotelial contacta con la sangre que fluye y hace que se adhieran las plaquetas circulantes. La adherencia plaquetaria se logra por las interacciones entre las glucoproteínas VI plaquetarias y el colágeno. Además, ocurren interacciones entre el complejo de la glucoproteína plaquetaria Ib-V-IX y el factor de Von Willebrand unido al colágeno. Las integrinas plaquetarias contribuyen a la adherencia de las plaquetas al colágeno, el factor de Von Willebrand, el fibrinógeno y otras plaquetas. La trombina inicia de forma independiente la activación plaquetaria e interactúa con un receptor de la superficie plaquetaria, liberando ADP, serotonina y tromboxano A₂. (31)

Estas sustancias refuerzan la agregación plaquetaria. El tromboxano A₂ y la serotonina son, además, potentes mediadores de la vasoconstricción. La agregación plaquetaria en el entorno de la matriz de fibrina forma un coágulo. El trombo impide el sangrado continuado, establece una barrera protectora y proporciona un reservorio a las sustancias liberadas por la desgranulación de las plaquetas. (34)

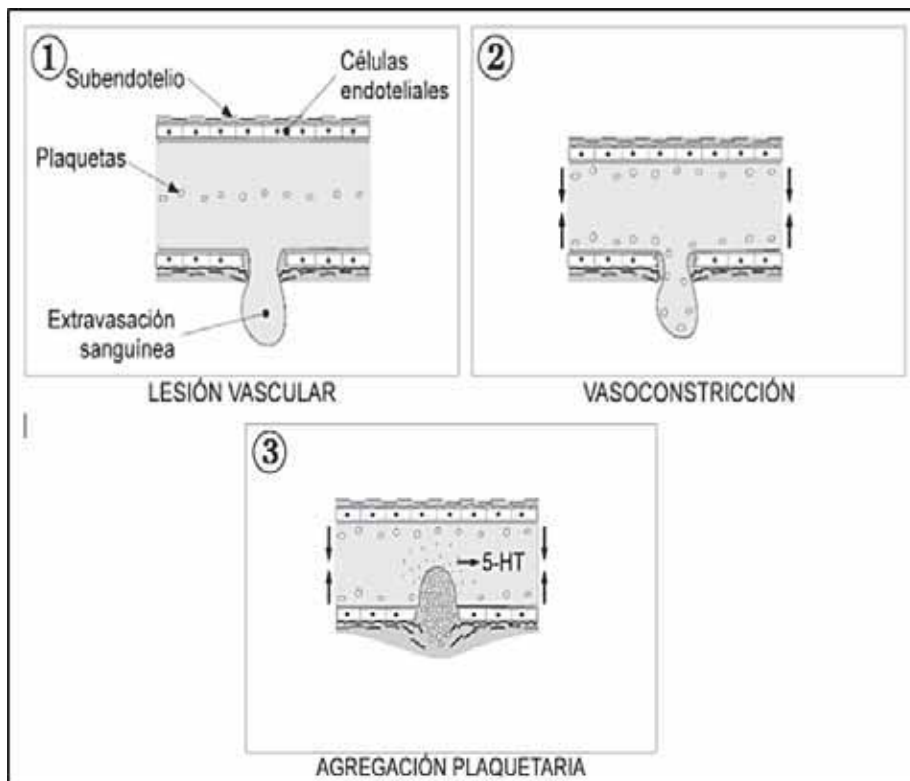


Figura 2. Fases de la Hemostasia. (35)
 Fuente: Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos.

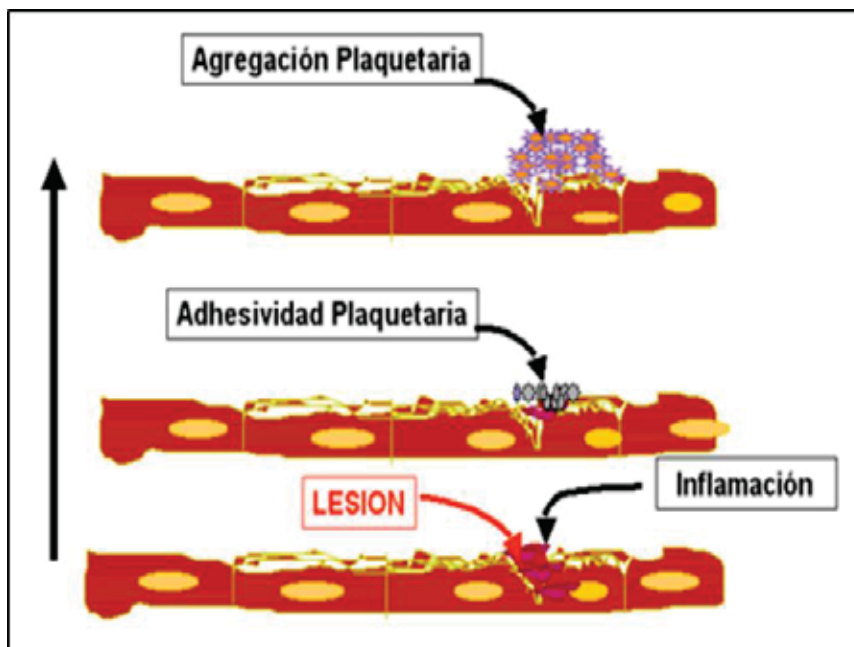


Figura 3: Fase Vascular y Fase Plaquetaria. (36)
 Fuente: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2011/10/la-coagulacion.pdf>

2.3.2.4 Fase Sanguínea o Coagulación o Hemostasia Secundaria.

La coagulación es un proceso que conduce a un cambio en el estado físico del plasma. Este cambio del plasma consiste en una gelificación del mismo.

La gelificación del plasma se produce debido a la transformación de una de las proteínas solubles que contiene, llamado fibrinógeno, en otra insoluble conocida como fibrina. La fibrina se estructura en forma de red, que consolida el agregado plaquetario dando lugar al coágulo. (35)

El proceso de la coagulación es un sistema de amplificación biológico que permite que pocas moléculas de los productos iniciadores inicien la activación secuencial de una serie de proteínas inactivas, esto con el afán de producir fibrina. Casi todos los factores de la coagulación son proteasas séricas (enzimas desdobladoras) que circulan inactivas hasta que son activadas por la proteasa sérica. Sólo los factores V, VIII y el fibrinógeno no son enzimas desdobladoras. Las reacciones de la cascada de la coagulación, que conducen a la formación de fibrina, se dividen en dos vías principales que se superponen: la intrínseca y la extrínseca. La porción final de ambas es la vía común. El producto final, tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca, es el coágulo de fibrina que se genera a partir del fibrinógeno. (37)

La hemostasia secundaria depende de la interacción de las proteínas plasmáticas o factores de coagulación entre sí, que se activan en una serie de reacciones en cascada conduciendo a la formación de fibrina. (38)

El hecho principal en esta fase es la conversión catalizada por trombina, de fibrinógeno (sustancia soluble) a fibrina (red polimerizada insoluble) en el sitio del daño vascular. (39). La coagulación propiamente dicha es un proceso destinado a formar una malla de fibrina que sirve para fijar el trombo adherido a la lesión y atrapar a los eritrocitos formando un coágulo sanguíneo. (40)

La generación de fibrina es el paso final de la hemostasia secundaria o coagulación hemostática que se desarrolla sobre superficies fosfolipídicas y en contacto con el endotelio lesionado, siendo amplificada mediante una serie de reacciones enzimáticas proteolíticas secuenciales y modificada por mecanismos de

retroalimentación positivos o negativos, resultando, un trombo hemostático rico en fibrina y hematíes (trombo rojo). (41)

- **Mecanismo General.**

La coagulación tiene lugar en tres etapas esenciales:

1. Tras la ruptura del vaso o una lesión vascular, se desencadena una cascada compleja de reacciones químicas en la sangre en la que intervienen varios factores de la coagulación. El resultado neto es la formación de un complejo de sustancias activadas denominadas en conjunto activador de la protrombina.
2. El activador de la protrombina cataliza la conversión de protrombina en trombina.
3. La trombina actúa como una enzima y convierte el fibrinógeno en fibrina, que atrapan en su red plaquetas, células sanguíneas y plasma para formar el coagulo. (42)

2.3.2.4.1 Modelo Actual de Coagulación.

Aunque la teoría clásica de la coagulación fue el esquema de Morawitz en 1904, quien admitió que los tejidos vasculares liberan una tromboplastina tisular necesaria para iniciar el proceso de coagulación, y propuso los cuatro componentes esenciales para la coagulación en plasma: protrombina, fibrinógeno, calcio y tromboplastina. Estas ideas surgieron a principios del siglo XX y son las que actualmente prevalecen la trombocinasa es mejor conocida como el FT (factor tisular). Morawitz es considerado como el padre de la coagulación. (43).

El modelo actual se centra en el inicio de la coagulación en el complejo formado por el factor tisular (FT) y el factor VII activado (FT-FVIIa), el cual se activa donde hay daño tisular. Este complejo actúa sobre la superficie de células portadoras del factor tisular y activa diferentes factores como el factor V y el factor IX, iniciando el proceso de la coagulación. (44)

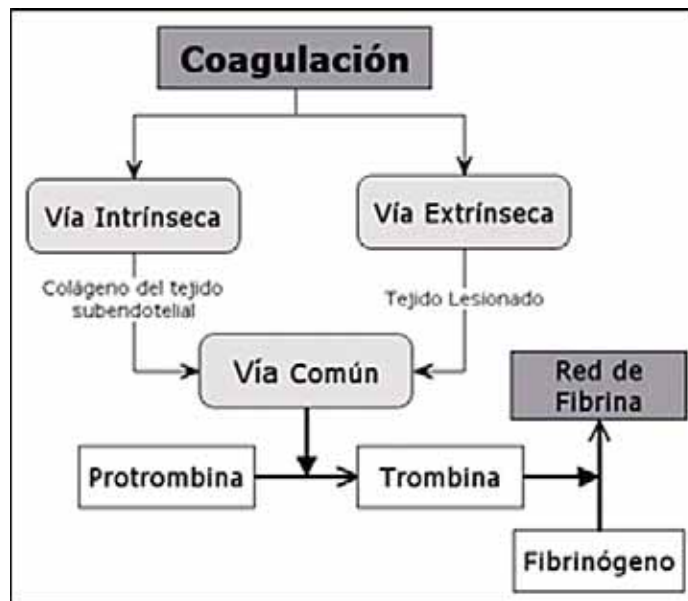


Figura 4: Coagulación. (36)

Fuente: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2011/10/la-coagulacion.pdf>

El modelo celular establece que la coagulación es regulada por la interacción del complejo FVIIa-FT y las propiedades de la superficie celular. En este, se enfatiza el papel que tienen los receptores específicos para los factores de coagulación, sobre todo en la plaqueta y en la célula endotelial, la coagulación es un proceso que ocurre en tres fases que se superponen una a otra y son: (43)

2.3.2.4.1.1 Fase I de Iniciación: Exposición de factor tisular tras la lesión vascular.

La fase de iniciación, que tiene lugar en las células productoras de FT, como fibroblastos o monocitos, y lleva a la generación de los factores Xa, IXa y pequeñas cantidades de trombina, suficientes para iniciar el proceso.

El FT es el principal iniciador de la coagulación in vivo y un componente integral de la membrana celular. Durante el proceso hemostático que tiene lugar tras la lesión vascular, se produce el contacto de la sangre circulante con el subendotelio, lo que favorece la unión del FT con el Factor VII circulante y su posterior activación. El complejo FT/VIIa activa los factores IX y X. El factor Xa se combina en la superficie celular con el factor Va para producir pequeñas cantidades de trombina, que jugarán

un papel preponderante en la activación de plaquetas y factor VIII durante la siguiente fase. Es importante anotar que el factor VII es el único factor de la coagulación que circula activo en pequeñas cantidades (1%), lo cual le permite interactuar de manera rápida con el FT9. (45)

En todos los casos se forma el activador de la protrombina, que transforma la protrombina en trombina e inicia todos los pasos posteriores de la coagulación.

En general se considera que el activador de la protrombina se forma por dos vías, aunque en realidad las dos vías interactúan constantemente.

- La vía extrínseca, que comienza con el traumatismo de la pared vascular y de los tejidos adyacentes, y
- La vía intrínseca, que se inicia en la propia sangre. (42)

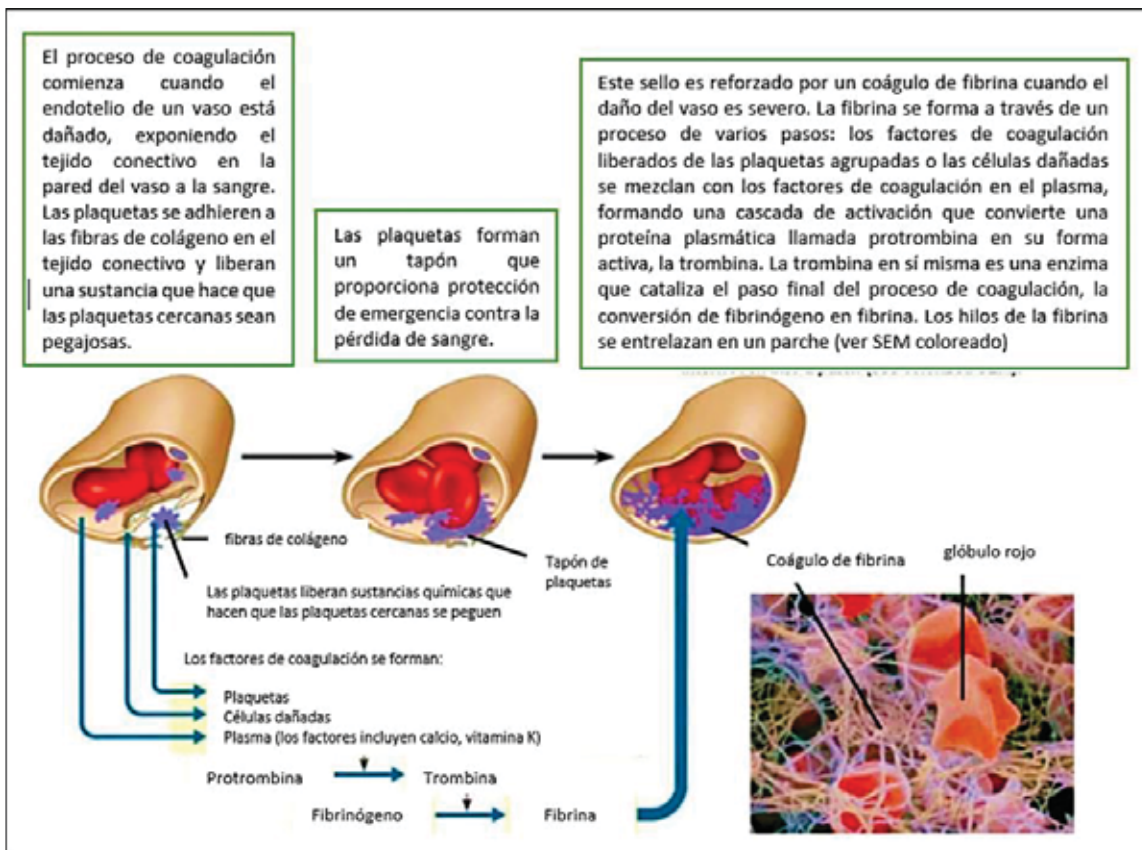


Figura 5: Mecanismo de Coagulación de la Sangre.
Fuente: Plaquetas, Hemostasia y Coagulación de la Sangre. (46)

2.3.2.4.1.1.1 Vía Intrínseca de la Coagulación.

La vía intrínseca podría definirse como la coagulación que es iniciada por componentes contenidos dentro del sistema vascular. El proceso se inicia con un traumatismo a la propia sangre o el contacto de ésta con una superficie diferente a la del endotelio del vaso sanguíneo, produciéndose la activación del FXII (de contacto) y continuando con una serie de reacciones enzimáticas en cascada que concluyen con la formación del FXa que, con fosfolípidos plaquetarios, Ca^{2+} y factor V constituyen el activador de protrombina. Se trata de una vía más lenta que la anterior. Este proceso está precedido de la activación del factor IX, una proteasa sérica dimérica, lo que proporciona una vía independiente para el factor VII de la coagulación de la sangre. Sin embargo, una diferencia importante existe entre las dos vías en la cascada de la coagulación. Si consideramos que la activación de factor IX, por XIa sólo requiere la presencia de calcio ionizado, la activación del factor IX por VIIIa requiere calcio y el cofactor de la proteína, el factor tisular, incrustado en una celda de la membrana (bicapa lipídica). El papel de las proteínas del sistema de contacto en la iniciación de la vía intrínseca de la coagulación es discutible, ya que sólo una deficiencia de factor XI se asocia con una tendencia hemorrágica. Estas proteínas participan en cambio, en la iniciación de la respuesta inflamatoria, la activación del complemento, fibrinólisis, la angiogénesis y la formación de quinina y los estudios demuestran que el quininógeno es una proteína anticoagulante in vivo. El mecanismo puede ser la inhibición de la unión de bajas concentraciones de trombina a la GP Ib / IX de las plaquetas. El sistema de contacto se implica cuando la sangre interactúa con una superficie exterior. El factor de zimógeno XII (factor de Hageman) es la primera proteína en la serie de reacciones fuertemente reguladas y se une a superficies cargadas negativamente como el caolín, sulfato de dextrano, y sulfátidos. La cadena pesada del factor XII se une a la superficie, lo que permite un gran aumento en la concentración local de la enzima, su auto activación, y la acción sobre sus sustratos, precalicreína y el factor XI, para formar calicreína y el factor XIa. En la mayoría de las enzimas de la coagulación, la cadena ligera contiene los lugares activos de residuos de serina, histidina y ácido aspártico, y es homóloga a la proteasa sérica arquetipo quimotripsina, mientras que

la cadena pesada contiene regiones vinculantes a las superficies, fosfolípidos, membrana celular y tejido conjuntivo, los cuales definen el único papel de cada enzima proteolítica de la coagulación. Recientemente, se ha observado que la ausencia del factor XII en el sistema de coagulación, no altera el proceso fisiológico de la hemostasia. El ensamblaje de un cofactor, la enzima y el sustrato es un proceso constante en la coagulación de la sangre, resultando en la máxima eficiencia y velocidad de las reacciones moleculares, especialmente como un fosfolípido o membrana celular que proporciona la superficie para una posición eficiente de interactuar de los complejos enzimáticos con los sustratos proenzima. La regulación de retroalimentación negativa es una característica del sistema de coagulación. Una de estas reacciones es el factor de división XIa de la cadena ligera HK, que contiene la actividad coagulante, destruyendo así su actividad cofactor y permitiendo al factor XIa para disociarse de la superficie activa. Del mismo modo, la trombina activa los factores V y VIII, pero, sin embargo, la conversión de la proteína C en proteína C activada conduce a la destrucción de los factores Va y VIIIa. Aunque la deficiencia de cualquiera de las tres proteínas implicadas en la vía del sistema de contacto resulta en la generación lenta de trombina y un tiempo parcial de tromboplastina in vitro prolongado, su efecto in vivo parece no estar relacionado o ser lo contrario. HK es una proteína con función antitrombótica después de la lesión endotelial y una deficiencia puede predisponer a la trombosis. La deficiencia del factor XII, ha sido implicada como un factor de riesgo venoso y tal vez la trombosis arterial, por lo que podría ser un anticoagulante natural. (47)

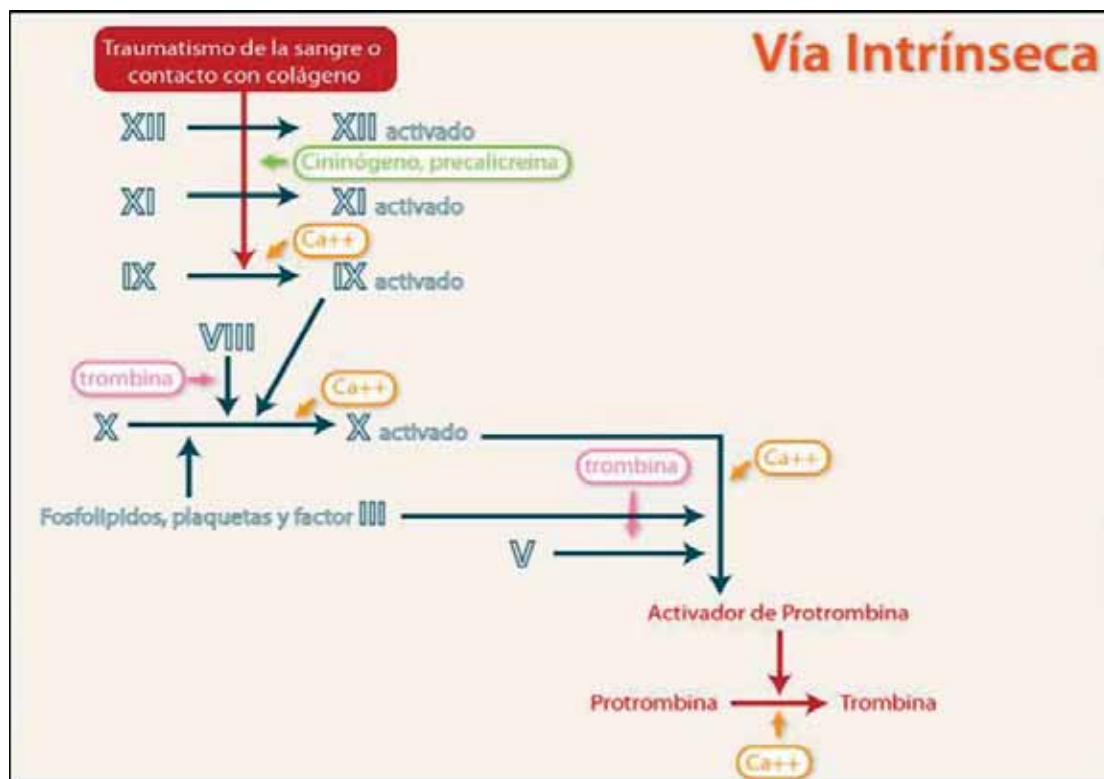


Figura 6: Vía Intrínseca de la Coagulación.

Fuente: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2011/10/la-coagulacion.pdf> (36)

2.3.2.4.1.1.2 Vía Extrínseca de la Coagulación.

La vía principal para el inicio de la coagulación sanguínea “in vivo” es la extrínseca, la cual contiene componentes tanto de la sangre como de los elementos vasculares. El componente fundamental de esta vía es el factor tisular; una proteína intrínseca de membrana compuesta por una única cadena polipeptídica que funciona como cofactor del factor VIII en la vía intrínseca y del factor V en la vía común. El inhibidor de la vía del factor tisular es una proteína que en asociación con el factor Xa inhibe los complejos del factor tisular-factor VII. La síntesis del factor tisular en los macrófagos y en las células endoteliales está inducida por endotoxinas y por citoquinas como la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF). (48)

El componente del plasma más importante en la vía extrínseca es el factor VII, uno de los factores dependientes de la vitamina K que son sintetizados como prozimógenos y convertidos (activados) a proteasas séricas por un limitado número de divisiones proteolíticas. La proteína S, que también es una proteína dependiente

de la vitamina K, es un cofactor en lugar de un zimógeno. Estas proteínas tienen en común los residuos del ácido B-glutamil carboxilo (GLA) con un extremo N-terminal, que requiere de la vitamina K para una adecuada síntesis por los hepatocitos. Esta modificación postribosomal de la proteína es necesaria para la unión del calcio (un calcio con 2 grupos carboxilo de un residuo Gla), de tal modo que actúa como un puente para la unión de la proteína a los fosfolípidos de la superficie. Tanto el factor IX como el factor X se activan por el complejo FT-factor VIIa y el mismo factor Xa. La forma activa se denomina factor de g-glutamil VIIa y representa aproximadamente el 1% del total del factor VII. La interacción entre las vías intrínseca y extrínseca se produce a varios niveles de la cascada de la coagulación. El zimógeno del factor VII tiene mínima actividad proteasa y es capaz de su autoactivación. El factor VIIa, complejo factor tisular enzimático, que se ensambla con el monocito activado o las células endoteliales alteradas, tiene dos substratos principales, el factor IX y el factor X, ambas proteínas son dependientes de la vitamina K. El cofactor necesario para que el factor IXa catalice la conversión del factor X al factor Xa es el factor VIII, mientras que para la conversión de Xa protrombina en trombina es el factor V. El factor VIII está en el plasma principalmente como un complejo no covalente con el FVW, y su función dentro de la coagulación es acelerar la conversión del factor IXa del factor X a Xa. (49)

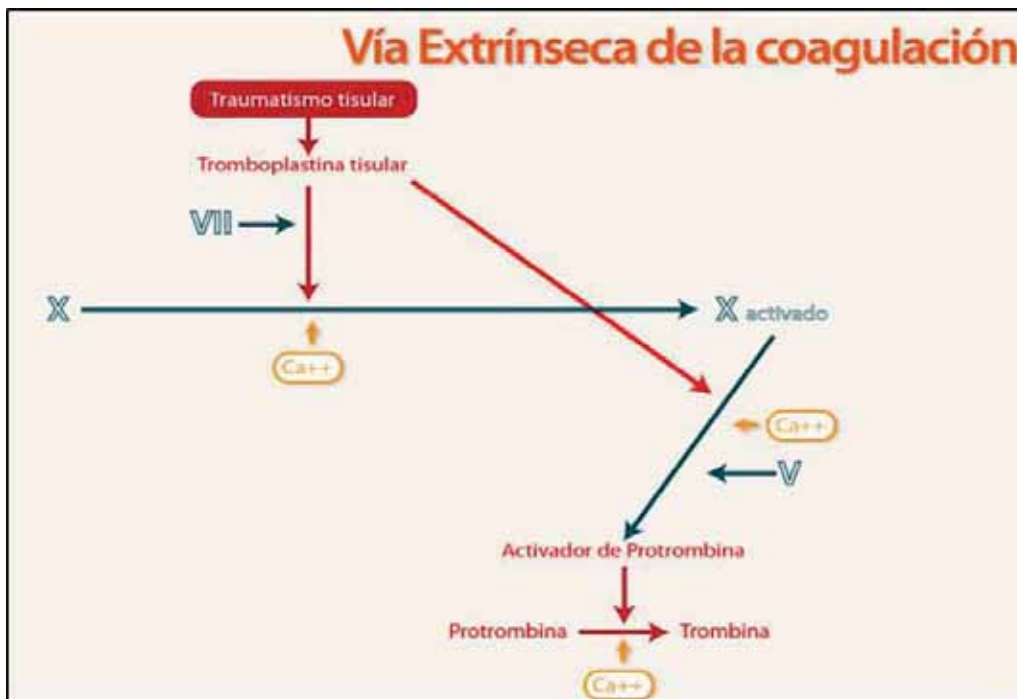


Figura 7: Vía Extrínseca de la Coagulación.

Fuente: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2011/10/la-coagulacion.pdf> (36)

2.3.2.4.1.2 Fase II de Amplificación: Trombina generada en células donde se expone el factor tisular.

La Fase de la amplificación se traslada a la superficie de las plaquetas, que son activadas por la trombina generada y acumulan factores y cofactores en su superficie, lo que permite el ensamblaje necesario para que tengan lugar las reacciones enzimáticas.

El daño vascular favorece el contacto de las plaquetas y componentes plasmáticos con tejidos extravasculares. Las plaquetas se adhieren a la matriz sub endotelial, y son activadas en lugares donde se ha expuesto FT. Las pequeñas cantidades de trombina generadas amplifican la señal procoagulante inicial y, por ende, activan los factores V, VIII y XI, que se ensamblan en la superficie plaquetaria. (45)

2.3.2.4.1.3 Fase III de Propagación: Generación de trombina sobre la superficie plaquetaria y explosión de trombina.

En la fase final, de propagación, las proteasas se combinan con los cofactores en la superficie plaquetaria, y se promueve la generación de grandes cantidades de trombina que favorecen la formación de fibrina.

Durante esta fase, el complejo “tenasa” (VIIIa, IXa, Ca⁺⁺ y fosfolípidos) cataliza la conversión de factor Xa, mientras que el complejo “protrombinasa” (Xa, Va, Ca⁺⁺ y fosfolípidos) cataliza, en la superficie plaquetaria, la conversión de protrombina en grandes cantidades de trombina (“explosión de trombina”), necesarias para la formación de un coágulo estable de fibrina. La protrombinasa es 300.000 veces más activa que el factor Xa en catalizar la activación de protrombina. La trombina generada activaría, así mismo, al factor XIII o factor estabilizador de la fibrina, y a un inhibidor fibrinolítico (TAFI) necesarios para la formación de un coágulo de fibrina resistente a la lisis. (45)

2.3.2.5 Fase de Hemostasia o Fibrinólisis.

La fibrinólisis es un mecanismo esencial para eliminar los coágulos de fibrina durante la fase de cicatrización, así como remover los coágulos intravasculares para impedir la trombosis. El efector final del sistema es la plasmina, que degrada la fibrina en productos de degradación (PDF y dímero D). La plasmina es producida a partir de un precursor inactivo, el plasminógeno, por acción de dos activadores del plasminógeno: activador tisular (t-PA) y activador tipo urocinasa (u-PA). La regulación de los activadores tiene lugar por la acción de inhibidores (PAI), de los que el más relevante es el PAI-1, mientras que la plasmina circulante es rápidamente inhibida por la α_2 - antiplasmina, lo que evita una fibrinólisis sistémica.

La fibrinólisis se inicia por el t-PA liberado desde el endotelio en respuesta a diversos estímulos (trombina, oclusión venosa, ejercicio físico, etc). Una vez liberado se une a la fibrina donde activa el plasminógeno a plasmina que degrada la fibrina del coágulo. La trombina puede activar otro inhibidor fibrinolítico, el TAFI, el cual elimina residuos de lisina de la fibrina, lo que impide la unión del plasminógeno y ulterior degradación del coágulo. (45)

ESQUEMA DE LA COAGULACION

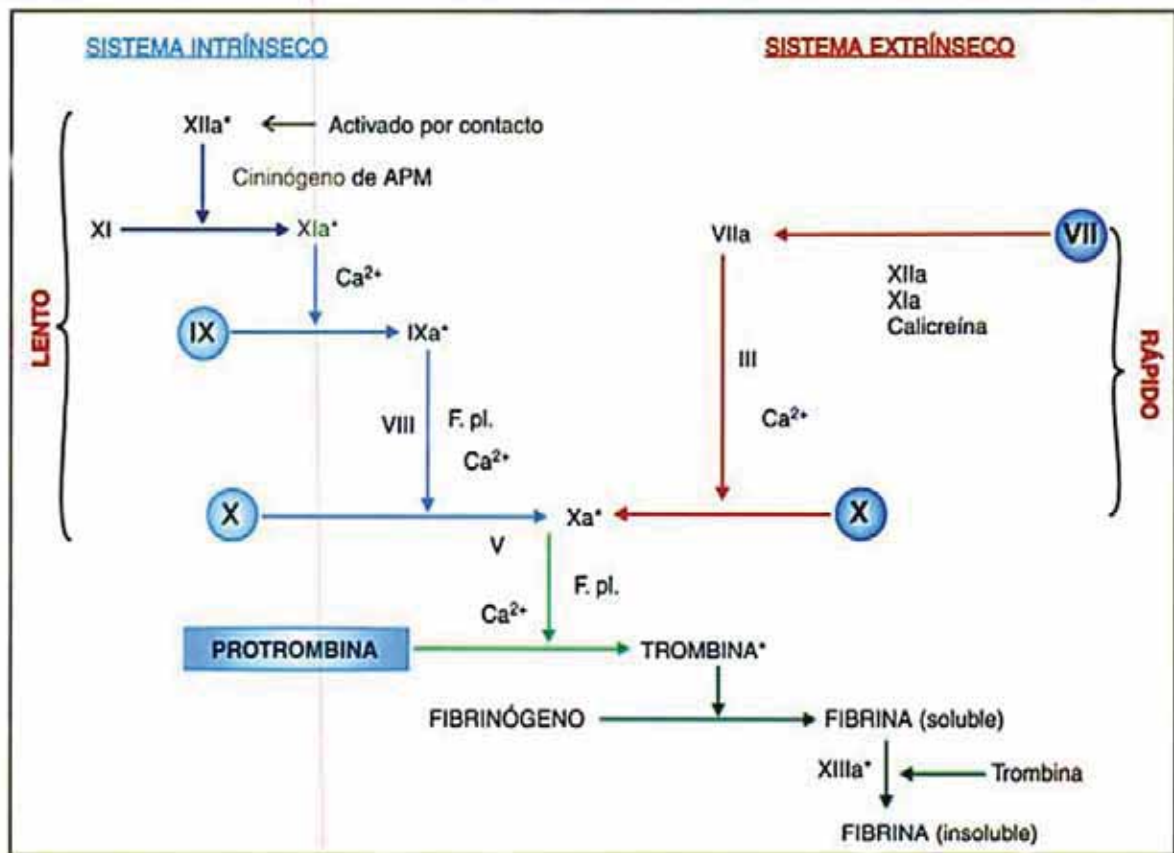


Figura 8: Cascada de la Coagulación. Se han rodeado con un círculo los factores vitamina K-dependientes; * inactivado por heparina; a, forma activada; F.pl., fosfolípido plaquetario; APM, alto peso molecular.

Fuente: Farmacología en Odontología. Fundamentos Por K. D. Tripathi. (50)

2.3.3 Ácido Tranexámico

a) Descripción.

El ácido tranexámico es un inhibidor de la fibrinólisis que se utiliza para controlar la hemostasia cuando la fibrinólisis contribuye al sangrado. (51)

b) Mecanismo de Acción.

El ácido tranexámico es un inhibidor competitivo de la activación del plasminógeno, y a concentraciones mucho más altas, un inhibidor no competitivo de la plasmina, es decir, muestra unas acciones similares al ácido aminocaproico. El ácido tranexámico es unas 10 veces más potente "in vitro" que el ácido aminocaproico, se une más fuertemente que el ácido aminocaproico tanto a los receptores fuertes como a los débiles de la molécula de plasminógeno. El ácido tranexámico en una concentración de 1 mg/mL no produce "in vitro" la agregación plaquetaria.

El ácido tranexámico en concentraciones tan bajas como 1 mg/ mL puede prolongar el tiempo de trombina. Sin embargo, el ácido tranexámico en concentraciones de hasta 10 mg/ mL en la sangre no muestra ninguna influencia en el recuento de plaquetas, el tiempo de coagulación, u otros factores de coagulación en sangre entera o sangre citrada de sujetos normales. (51)

c) Farmacocinética.

La unión a las proteínas plasmáticas del ácido tranexámico es aproximadamente un 3% cuando los niveles plasmáticos son los terapéuticos. El ácido tranexámico no se une a la albúmina sérica.

Después de una dosis intravenosa de 1g, la curva de concentración en plasma frente al tiempo muestra un decaimiento triexponencial con una semi-vida media de aproximadamente 2 horas para la fase de eliminación terminal. El volumen inicial de distribución es de aproximadamente 9 a 12 litros. (51)

La excreción urinaria es la principal vía de eliminación a través de filtración glomerular y más del 95% de la dosis se excreta en la orina como fármaco inalterado. La excreción de ácido tranexámico es de aproximadamente el 90% a las 24 horas después de la administración intravenosa de 10 mg/kg de peso corporal.

Una concentración antifibrinolítica de ácido tranexámico permanece en diferentes tejidos durante aproximadamente 17 horas, y en el suero, hasta siete u ocho horas. (51)

El ácido tranexámico pasa a través de la placenta. La concentración en la sangre del cordón después de una inyección intravenosa de 10 mg/ kg en las mujeres embarazadas es de aproximadamente 30 mg/ml, tan alta como en la sangre materna. El ácido tranexámico se difunde rápidamente en el líquido articular y la membrana sinovial. En el líquido de la articulación, se obtiene la misma concentración que el suero. La semi-vida biológica de ácido tranexámico en el líquido de la articulación es de aproximadamente tres horas. (51)

La concentración de ácido tranexámico en otros tejidos es menor que en la sangre. En la leche materna, la concentración es de aproximadamente una centésima parte de la concentración máxima en suero. La concentración de ácido tranexámico en el líquido cefalorraquídeo es aproximadamente una décima parte de la del plasma. El fármaco se excreta en el humor acuoso, siendo la concentración aproximadamente una décima parte de la concentración plasmática.

El ácido tranexámico se ha detectado en el semen donde inhibe la actividad fibrinolítica, pero no influyen en la migración de los espermatozoides. (51)

d) Toxicidad.

Se observó un aumento de la incidencia de leucemia en ratones machos que recibieron el ácido tranexámico en los alimentos a una concentración de 4.8% (equivalente a dosis de 5 g/kg/ día). No se incluyeron en este estudio ratones hembra.

Se han reportado hiperplasia de las vías biliares, colangioma y adenocarcinoma intrahepático del sistema biliar en una cepa de ratas después de la administración diaria de dosis superiores a la dosis máxima tolerada durante 22 meses. Con dosis más bajas se observó hiperplasia, pero no neoplasias. No se detectó actividad mutagénica en varios sistemas de ensayo in vitro e "in vivo".

No existen datos clínicos para evaluar los efectos del ácido tranexámico en la fertilidad. Las ciruelas frescas son una rica fuente de compuestos fenólicos, muchos de ellos concentrados en la piel de la fruta que lo contiene. (51)

2.3.4 Determinación de la Toxicidad Aguda.

2.3.4.1 Aspectos Toxicológicos.

La evaluación de la actividad tóxica de los extractos vegetales o compuestos purificados es indispensable para considerar que un tratamiento es seguro. Los objetivos de los ensayos de toxicidad son:

- Definir la toxicidad intrínseca de la planta.
- Predecir el daño de una especie.
- Determinar la especie más susceptible.
- Identificar los órganos blancos
- Informar sobre el riesgo de exposición aguda.
- Seleccionar las dosis para estudios prolongados.
- Diagnosticar los efectos de una sobredosis aguda.
- Predecir el tratamiento de una sobre dosis aguda. (52)

2.3.4.2 Estudio de Toxicidad Aguda.

Consiste en administrar el compuesto, extracto; a los animales en una ocasión, una dosis única.

El objetivo de este ensayo es determinar la sinología y sintomatología consiguiente a la administración del compuesto en cuestión y su grado de letalidad. El procedimiento inicial consiste en investigar una serie de rangos de dosis del

compuesto en una única especie de animales. Esto requiere seleccionar una vía de administración, preparar el compuesto de una forma adecuada para su administración por la vía seleccionada y elegir una especie apropiada. (53)

2.3.4.3 Pruebas Toxicológicas.

- **Influencia de la Vía de Administración.**

Las sustancias químicas pueden ser introducidas en el complejo organismo biológico por varias vías: vía percutánea, vía parenteral, vía inhalatoria, vía oral, las propiedades químicas y físicas de cada compuesto determinan sustancialmente la vía por la que tiene lugar la exposición intencional o accidental. (53)

Las ratas y los ratones son animales bastante sensibles a sustancias tóxicas presentes en las plantas, la administración de los extractos en cantidades crecientes permite evaluar los límites de toxicidad, es decir, permite determinar la cantidad (dosis) de droga que puede ser peligrosa o directamente mortal cuando se les administra en una o varias veces en 24 horas o menos, idealmente deben probarse dos vías, tres dosis y ambos sexos debiendo tomarse en cuenta factores como edad, sexo, peso, especie, condiciones ambientales, acceso a la comida y al agua. (54)

Las observaciones que se efectúan incluyen:

- Relación dosis respuesta.
- Síntomas y signos tóxicos.
- Conducta del animal durante el periodo de observación.
- Tiempo de muerte o velocidad de recuperación.
- Un estudio macro y microscópico de los órganos de los animales de experimentación, especialmente hígado, riñón, pulmón, y médula ósea.
- Durante la vida del animal se efectuarán exámenes hematológicos, de orina, de química sanguínea, con el fin de comprobar la completa inocuidad de la especie vegetal en el estudio. (54)

2.3.4.3.1 Prueba de Toxicidad por Vía Oral.

La mayoría de sustancias químicas administradas oralmente pueden tener un efecto sistémico en el organismo solo después que la absorción se haya producido desde la boca o el tracto gastrointestinal.

La toxicidad de las sustancias químicas administradas por vía oral puede variar según la frecuencia con que lo son y según en qué condiciones se hace. (53)

A. Criterio de Lorke.

Describe un método para la investigación de la toxicidad aguda de una sustancia desconocida, con la determinación de la DL50. Usando este método es posible obtener un número mínimo de animales de experimentación, información adecuada de la toxicidad aguda y de la DL50. Este método no presenta limitaciones y es aplicable a fármacos y sustancias de la agricultura e industria, este método también puede usarse por todas las vías de administración. (55)

Cuadro N°1: Modelo para Determinar las Dosis según el Test de Lorke.

DOSIS EN mg/kg			DOSIS ESCOGIDAS PARA EL SEGUNDO TEST			
Resultados de la Investigación Inicial			TEST			
10	100	1000				
0/3*	0/3	0/3		1,600	2,900	5,000
0/3	0/3	1/3	600	1,000**	1,600	2,900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	2,900
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100**	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	0/3	3/3	5	10**	20	40
2/3	0/3	3/3	2	4	8	16
0/3	0/3	3/3	1	2	4	8

*Número de animales que mueren/número de animales usados.

**Los resultados del primer Test son considerados para estas dosis.

Fuente: Lorke 1983. (55)

2.3.4.3.2 Prueba de Toxicidad por Vía Tópica.

Para introducirse en la piel la sustancia química debe de atravesar las células de la epidermis o entrar a través de los folículos. Aunque la vía transfolicular facilita el acceso a las capas más profundas de la piel a través de las células relativamente permeables de las glándulas sebáceas y las paredes foliculares, la vía a través de las células de la epidermis probablemente es el camino principal de penetración porque este tejido constituye la mayor parte de la superficie.

La absorción percutánea se define como la transferencia de una sustancia química desde la capa más exterior de la piel a través de la capa cornea, de la epidermis y de la dermis (corion), al sistema circulatorio.

La penetración de materiales a través de la piel está en función del tiempo, y esto puede ser demostrado por la aplicación de vendajes oclusivos para evitar la pérdida de material al centro de aplicación. (53)

Entre las pruebas de toxicidad por vía tópica figuran: irritación primaria en piel, ensayos de sensibilidad cutánea, ensayos de fotosensibilidad, y fotoalergia.

a) Irritación Primaria – Piel.

La evaluación de los efectos sobre la piel requiere el uso de un sistema de calificación para el grado de enrojecimiento y el de edema en el centro de aplicación de la gasa. Esta calificación implica la asignación relativa de números independientes para el grado de eritema y el de formación de edema. (53)

b) Toxicidad Aguda Dérmica (TAD) – Draize.

El ensayo de irritación dérmica se basa en la aplicación de una sustancia, ya sea sólida o líquida en una pequeña área de la piel de un mamífero. Después del tiempo de aplicación, generalmente 4 horas se valora la aparición de eritema o edema en la zona tratada. (56)

El día antes del ensayo los animales fueron depilados y rasurados tratando de no erosionar la piel del lomo. Se seleccionaron tres animales con la piel intacta. Aplicando 0.5 mL de la sustancia y se cubrió con un parche de gasa. Al final del

periodo de exposición de 4 horas, se removió la sustancia remanente con agua destilada evitando el daño a la epidermis. Las observaciones de las reacciones de eritema y edema en la zona de aplicación se realizan a 30 min, 1, 24 y 48 horas posteriores a la remoción del parche. (56)

Evaluándose según las escalas establecidas.

CUADRO N° 2: Calificación de la Toxicidad en piel – Escala de Lesiones

ERITEMA	CALIFICACION	EDEMA	CALIFICACION
ausencia	0	ausencia	0
Ligero (casi imperceptible)	1	Ligero (casi imperceptible)	1
Bien definido	2	Con bordes elevados	2
Moderado a severo	3	Moderado con las superficies salientes (aproximadamente en 1 mm)	3
Muy severo (color rojo remolacha con lesiones profundas).	4	Severo (con la superficie más saliente de 1mm y extendiéndose más allá del área de exposición).	4

Fuente: Loomis, 1984. (53)

2.3.4.4 Selección de Dosis.

La dosis inicial se determina mediante experimentación, tomado primero una dosis que no manifiesta efecto alguno en los animales. En los siguientes grupos de animales la dosis deberá aumentarse a razón de un múltiplo constante hasta que la dosis administrada alcance un nivel suficientemente elevado para producir severos signos de intoxicación o muerte en los animales. (53)

2.3.4.5 Relación Dosis Toxicidad.

El único factor que determina el grado de toxicidad de una sustancia es su dosis, si una dosis suficiente se introduce en el organismo o entra en contacto con un mecanismo biológico, un efecto tóxico será la consecuencia de que la capacidad de este mecanismo biológico para llevar a cabo una función, resulte destruida o

seriamente dañada y provoque una enfermedad o la muerte en dicho organismo. Para poder afirmar que una sustancia es más tóxica que otra es necesario establecer una comparación cuantitativa de la dosis. Esta comparación solo tendrá valor si es efectuada en el organismo considerado en idénticas condiciones de experimentación. (5)

2.3.5 Determinación de la Cantidad de personas para realizar las pruebas In Vitro.

En la investigación médica, incluir más sujetos de estudio, no es sinónimo de mejor estudio. Por esta razón, se debe de planear el tamaño apropiado de la muestra antes de iniciarlo. Este proceso se conoce como la determinación de la fuerza o potencia del estudio, cuya definición es la capacidad de un estudio para identificar una diferencia de un tamaño dado, si en realidad la diferencia existe. (57)

Para la determinación del número de personas en la prueba de tiempo de coagulación y tiempo de protrombina, se realizó mediante una fórmula estadística que nos permite trabajar con una cantidad apropiada de voluntarios. Esta es una fórmula para calcular la muestra de trabajo.

Fórmula para hallar la Muestra:

$$n = \frac{(Z)^2 p \cdot q \cdot N}{(E)^2 (N - 1) + (Z)^2 p \cdot q}$$

2.4 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- HEMOSTASIA: La hemostasia es la respuesta del organismo al daño de los vasos sanguíneos y el sangrado. (37)
- COAGULACION: Proceso por el cual la sangre pierde su liquidez convirtiéndose en un gel, para formar un coágulo. (37)
- PROTROMBINA: Proteína precursora de la trombina en el proceso de coagulación de la sangre. (37)
- INR: Índice Internacional Normalizado o International Normalized Ratio, es un modo de estandarizar los resultados de pruebas de tiempo de protrombina, sin importar el método usado. Es la razón o cociente obtenido si se hubiera determinado con la tromboplastina de referencia: ISI. (58)
- ISI: Índice de Sensibilidad Internacional de la tromboplastina a calibrar respecto de la referencia.
- HEMOFILIA: Es un problema hemorrágico. Las personas con hemofilia no sangran más rápido de lo normal, pero pueden sangrar durante un período más prolongado. Su sangre no contiene una cantidad suficiente de factor de coagulación. (43)
- EDEMA: es la inflamación de los tejidos blandos secundaria a la acumulación de líquido intersticial. El líquido es predominantemente agua, pero en presencia de infección u obstrucción linfática puede acumularse líquido rico en proteínas y células. (59)
- ERITEMA: Es el enrojecimiento de la piel condicionado por una inflamación debida a un exceso de riego sanguíneo mediante vasodilatación, es un signo de distintas enfermedades infecciosas y de la piel. (59)
- QUINONAS: Productos carbonílicos resultantes de la oxidación de los fenoles, constituyen una gran clase de metabolitos secundarios. (60)
- VITAMINA K: 2-metil-1,4-naftoquinona; clínicamente útil, se utiliza para combatir ciertas enfermedades que se caracterizan por la reducción de la capacidad de coagulación de la sangre. (61)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.

3.1.1 Material Biológico.

- **Muestra Vegetal:** Planta Completa de *Castilleja pumila* “misk’icha”.
- **Sangre Venosa Humana:** (para determinación del efecto coagulante y del tiempo de Protrombina in vitro).
- **Animales de Experimentación:** (para la determinación del efecto hemostático in vivo). Se utilizaron ratones albinos *Mus musculus*.

3.1.2 Materiales e Instrumentos de Laboratorio.

3.1.2.1 Materiales de Campo.

Recolección de la Muestra Vegetal.

- Tijeras de podar
- Cuchillo
- Bolsas de papel kraf o costales de fibra de vidrio
- Hojas de papel periódico
- Cuaderno de anotaciones de campo
- Plumones de tinta indeleble
- Cámara fotográfica

3.1.2.2 Materiales de Laboratorio.

➤ Materiales de Vidrio.

- Placas Petri
- Embudo
- Tubos de ensayo
- Equipo de reflujo
- Pipetas
- Probetas

➤ **Instrumentos de Laboratorio.**

- Balanza analítica de precisión 0.001g
- Estufa
- Baño María
- Termómetro

3.1.2.3 Reactivos.

- Etanol al 70%
- Bencina
- Reactivo Benedict
- Reactivo Dragendorf
- Reactivo Acetato de Cobre
- Reactivo Mayer
- Ácido clorhídrico HCl concentrado al 1%, al 5%
- Hidróxido de sodio NaOH al 20%
- Hidróxido de potasio KOH al 10%
- Solución de ninhidrina al 1%
- Limaduras de magnesio
- Cloruro férrico al 1%
- Cloroformo CHCl₃
- Carbón activado
- Ácido sulfúrico concentrado H₂SO₄
- Acido Pícrico 1%
- Éter etílico
- Ácido Tranexámico.
- Reactivo SOLUPLASTIN 10x2mL.

3.1.2.4 Otros Materiales.

- Molino de granos
- Tamizador
- Envase de vidrio oscuro

- Gasa
- Algodón
- Cronómetro

3.2 Diseño Metodológico.

3.2.1 Tipo de Investigación.

Se realizó un estudio cuasiexperimental con postprueba únicamente y grupo control; además que los animales de experimentación no se asignaron al azar; sino que dichos grupos ya estaban formados antes del experimento.

Esto relacionado a que el diseño incluye dos grupos, uno que recibe el tratamiento experimental y el otro no, el cual viene a ser el grupo control; ambos grupos se les realiza una medición sobre la variable independiente de estudio.

3.2.2 Determinación de la Cantidad de personas para realizar la prueba de Tiempo de Coagulación y Tiempo de Protrombina.

Por ello para la determinación del número de personas en la prueba de tiempo de coagulación y tiempo de protrombina, se realizó mediante una fórmula estadística que nos permite trabajar con una cantidad apropiada de voluntarios. Esta fórmula es usada para calcular el tamaño de muestra cuando se conoce el tamaño de la población. Por consiguiente, teniendo como base de referencia el número de alumnos matriculados de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica en un total de 400 alumnos, la elección de los voluntarios fue determinada por la aceptabilidad que ellos tenían respecto al estudio de investigación.

Fórmula para Calcular la Muestra de Trabajo:

DATOS DE INGRESO	
$Z^2 = 1.645$	Es el Valor de la Tabla Estadística según el Nivel de Error que se desea cometer (90% = 1.645)
$E^2 = 0.100$	Error Máximo Permisible (10%) que es igual a (1.645)
$p = 0.500$	Proporción de la Población que tiene característica de interés que nos interesa medir.
$q = 0.500$	Es la Proporción de la Población que no tiene la característica de interés que nos interesa medir.
$N = 400$	Población Total del Ámbito del Estudio

Fórmula para hallar la Muestra:

$$n = \frac{(Z)^2 p \cdot q \cdot N}{(E)^2 (N - 1) + (Z)^2 p \cdot q} \quad \longrightarrow \quad n = \frac{(2.7060)(0.500)(0.500)(400)}{(0.0100)(2.084) + (2.7060)(0.2500)}$$

$$n = \frac{270.6025}{21.5165} \quad \longrightarrow \quad n = 12.58 \quad \longrightarrow \quad n = 12$$

Bajo este resultado, dándonos como valor final la cantidad de 12 voluntarios para la realización en la prueba de tiempo de coagulación y tiempo de protrombina, se utilizó la cantidad de 10 muestras para tales pruebas; las otras 2 muestras no cumplían con los criterios de inclusión, por lo que fueron descartadas para el desarrollo de la investigación.

3.2.3 Diseño de la Investigación Experimental.

a) Determinación del efecto Coagulante del extracto seco Hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Estudio que determina la actividad Coagulante con el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha” en muestras de sangre venosa humana utilizando diferentes dosis.

	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆	G ₇	G ₈	G ₉	G ₁₀
X	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉	O ₁₀
X ₁	O ₁₁	O ₁₂	O ₁₃	O ₁₄	O ₁₅	O ₁₆	O ₁₇	O ₁₈	O ₁₉	O ₂₀
X ₂	O ₂₁	O ₂₂	O ₂₃	O ₂₄	O ₂₅	O ₂₆	O ₂₇	O ₂₈	O ₂₉	O ₃₀
X ₃	O ₃₁	O ₃₂	O ₃₃	O ₃₄	O ₃₅	O ₃₆	O ₃₇	O ₃₈	O ₃₉	O ₄₀

Donde:

G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆, G₇, G₈, G₉, G₁₀ = Grupos Experimentales.

X = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa con agua destilada.

X₁ = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa y concentración del extracto de 0.01mg/mL.

X₂ = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa y concentración del extracto de 0.1mg/mL.

X₃ = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa y concentración del extracto de 1mg/mL.

O = Medición del Tiempo de Coagulación del tubo con muestra de sangre venosa sin tratamiento.

O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, , O₄₀ = Medición del tiempo de hemostasia.

b) Determinación del Tiempo de Protrombina del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila “misk’icha”.

Estudio que determina el Tiempo de Coagulación del Plasma, con el extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila “misk’icha” en muestras de sangre venosa humana, utilizando diferentes dosis.

	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆	G ₇	G ₈	G ₉	G ₁₀
X	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉	O ₁₀
X ₁	O ₁₁	O ₁₂	O ₁₃	O ₁₄	O ₁₅	O ₁₆	O ₁₇	O ₁₈	O ₁₉	O ₂₀
X ₂	O ₂₁	O ₂₂	O ₂₃	O ₂₄	O ₂₅	O ₂₆	O ₂₇	O ₂₈	O ₂₉	O ₃₀
X ₃	O ₃₁	O ₃₂	O ₃₃	O ₃₄	O ₃₅	O ₃₆	O ₃₇	O ₃₈	O ₃₉	O ₄₀

Donde:

G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆, G₇, G₈, G₉, G₁₀ = Grupos Experimentales.

X = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa con agua destilada.

X₁ = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa y concentración del extracto de 0.01mg/mL.

X₂ = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa y concentración del extracto de 0.1mg/mL.

X₃ = Tubo de ensayo con muestra de sangre venosa y concentración del extracto de 1mg/mL.

O = Medición del Tiempo de Protrombina del tubo con muestra de sangre venosa sin tratamiento.

O₁, O₂, O₃, O₄, O₅,, O₄₀ = Medición del tiempo de protrombina.

c) Determinación del efecto Hemostático del extracto seco Hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Estudio que determina la actividad Hemostática con el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha” en heridas producidas a ratones, utilizando diferentes dosis.

G₁ X₁ O₁

G₂ X₂ O₂

G₃ X₃ O₃

G₄ X₂ O₂

G₅ X₅ O₅

Donde:

G₁ = Grupo Control constituido por 10 ratones.

G₂, G₃, G₄, G₅ = Grupos experimentales constituido por 10 ratones cada uno.

X₁ = Dosis de 100mg/kg de suero fisiológico usado como nuestro control.

X₂ = Dosis de 10mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*

X₃ = Dosis de 100mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*

X₄ = Dosis de 1000mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*

X₅ = Dosis de dosis 1000mg/Kg del patrón a utilizar, Acido Tranexámico.

O₁, O₂, O₃, O₄, O₅ = Medición del tiempo de hemostasia.

d) Determinación de la toxicidad aguda por vía oral y Dérmica del extracto seco Hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila “misk’icha”.

Estudio que determina la toxicidad aguda por vía oral y tópica con la administración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila “misk’icha” en ratones, utilizando diferentes dosis.

Toxicidad por Vía Oral.

FASE I

G ₁	X ₁	O ₁	O ₅	O ₉	O ₁₃	O ₁₇	O ₂₁	O ₂₅	O ₂₉	O ₃₃	O ₃₇	O ₄₁	O ₄₅	O ₄₉
G ₂	X ₂	O ₂	O ₆	O ₁₀	O ₁₄	O ₁₈	O ₂₂	O ₂₆	O ₃₀	O ₃₄	O ₃₈	O ₄₂	O ₄₆	O ₅₀
G ₃	X ₃	O ₃	O ₇	O ₁₁	O ₁₅	O ₁₉	O ₂₃	O ₂₇	O ₃₁	O ₃₅	O ₃₉	O ₄₃	O ₄₇	O ₅₁
G ₄	X ₄	O ₄	O ₈	O ₁₂	O ₁₆	O ₂₀	O ₂₄	O ₂₈	O ₃₂	O ₃₆	O ₄₀	O ₄₄	O ₄₈	O ₅₂

Donde:

G₁ = Grupo control constituido por 3 ratones.

G₂,G₃,G₄ = Grupos experimentales formados por 3 ratones.

X₁ = Dosis de suero fisiológico 0.2ml

X₂ = Dosis de 10mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

X₃ = Dosis de 100mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

X₄ = Dosis de 1000mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

O₁,O₂,O₃,O₄ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 5 min.

O₅,O₆,O₇,O₈ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 10 min.

O₉,O₁₀,O₁₁,O₁₂ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 15 min.

O₁₃,O₁₄,O₁₅,O₁₆ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 30 min.

O₁₇,O₁₈,O₁₉,O₂₀ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 60 min.

O₂₁,O₂₂,O₂₃,O₂₄ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a la hora.

O₂₅,O₂₆,O₂₇,O₂₈ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 2 horas.

O₂₉,O₃₀,O₃₁,O₃₂ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 6 horas.

O₃₃,O₃₄,O₃₅,O₃₆ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 12 horas.

O₃₇,O₃₈,O₃₉,O₄₀ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 24 horas.

O₄₁,O₄₂,O₄₃,O₄₄ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 2 días.

O₄₅,O₄₆,O₄₇,O₄₈ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 4 días.

O₄₉,O₅₀,O₅₁,O₅₂ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 7 días.

O₅₃,O₅₄,O₅₅,O₅₆ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 14 días.

FASE II

G ₁	X ₁	O ₁	O ₅	O ₉	O ₁₃	O ₁₇	O ₂₁	O ₂₅	O ₂₉	O ₃₃
G ₂	X ₂	O ₂	O ₆	O ₁₀	O ₁₄	O ₁₈	O ₂₂	O ₂₆	O ₃₀	O ₃₄
G ₃	X ₃	O ₃	O ₇	O ₁₁	O ₁₅	O ₁₉	O ₂₃	O ₂₇	O ₃₁	O ₃₅
G ₄	X ₄	O ₄	O ₈	O ₁₂	O ₁₆	O ₂₀	O ₂₄	O ₂₈	O ₃₂	O ₃₆

Donde:

G₁ = Grupo control constituido por 1 ratón.

G₂,G₃,G₄ = Grupos experimentales formados por 1 ratón.

X₁ = Dosis de suero fisiológico.

X₂ = Dosis de 1,600 mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

X₃ = Dosis de 2,900 mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

X₄ = Dosis de 5,000 mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

O₁,O₂,O₃,O₄ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 5 min.

O₅,O₆,O₇,O₈ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 10 min.

O₉,O₁₀,O₁₁,O₁₂ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 15 min.

O₁₃,O₁₄,O₁₅,O₁₆ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 30 min.

O₁₇,O₁₈,O₁₉,O₂₀ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a los 60 min.

O₂₁,O₂₂,O₂₃,O₂₄ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a la hora.

O₂₅,O₂₆,O₂₇,O₂₈ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 2 horas.

O₂₉,O₃₀,O₃₁,O₃₂ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 6 horas.

O₃₃,O₃₄,O₃₅,O₃₆ = Observación del efecto tóxico agudo o muerte a las 24 horas.

Toxicidad Aguda Tópica (Irritación Primaria en Piel)

G ₁	G _{1.1}	X ₁	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄
G ₂	G _{2.1}	X ₂	O ₈	O ₉	O ₁₀	O ₁₁
G ₃	G _{3.1}	X ₃	O ₁₅	O ₁₆	O ₁₇	O ₁₈
G ₄	X _{4.1}	X ₄	O ₂₂	O ₂₃	O ₂₄	O ₂₅

Donde:

G₁ = Grupo control constituido por 3 ratones.

G_{1.1} = Grupo control constituido por 3 ratones.

G₂, G₃, G₄ = Grupos experimentales formados por 3 ratones cada uno.

G_{1.1}, G_{2.1}, G_{3.1}, G_{4.1} = Subgrupos constituido por 3 ratones cada uno.

X₁ = Dosis de 0.5mL de agua destilada, constituyéndose en el grupo control.

X₂ = Dosis de 1gr del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

X₃ = Dosis de 3gr del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

X₄ = Dosis de 5gr del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila*.

O₁,O₈,O₁₅,O₂₂ = Observación de la reacción dérmica después de la aplicación del extracto a la 1 hora.

O₂,O₉,O₁₆,O₂₃ = Observación de la reacción dérmica después de la aplicación del extracto a 24 horas.

O₃,O₁₀,O₁₇,O₂₄ = Observación de la reacción dérmica después de la aplicación del extracto a las 48 horas.

O₄,O₁₁,O₁₈,O₂₅ = Observación de la reacción dérmica después de la aplicación del extracto a las 72 horas.

3.3 Identificación y Operacionalización de Variables.

3.3.1 Variables Implicadas.

3.3.1.1 Variables Independientes.

Concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

- **Definición conceptual:** Se define como la cantidad de extracto seco obtenido por maceración en etanol de toda la planta seca pulverizada de la especie en estudio a utilizar en diferentes concentraciones para comprobar la actividad hemostática y coagulante que se le atribuye. (62)
- **Definición Operacional:**
 - Naturaleza: cuantitativa
 - Unidad de Medida: mg/kg y/o mg/mL
 - Medición: directa
 - Instrumento de Medida: balanza analítica de precisión.
 - Procedimiento: de la cantidad obtenida del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha” se obtendrán diferentes concentraciones.
 - Indicador: cantidad del extracto seco que presenta actividad Coagulante y Hemostática.

3.3.1.2 Variables Dependientes.

I. Actividad Coagulante. (evaluación del tiempo de coagulación).

- **Definición conceptual:** Con esta prueba determinamos el tiempo en el que la sangre coagula. Esta vía valora la vía intrínseca de formación del activador de protrombina. Capacidad de producir o inducir in vitro la coagulación de la sangre. (63)

- **Definición Operacional:**

- Naturaleza: cuantitativa
- Unidad de Medida: minutos
- Medición: directa
- Instrumento de Medida: cronómetro
- Procedimiento: tubos de ensayo con 2mL de sangre se adiciona una concentración "X" del extracto y se mide el tiempo en que coagula la sangre.
- Indicador: *Tiempo de Coagulación*. El tiempo que transcurre para la transformación de la sangre de la forma líquida a la forma sólida; aparición del coágulo. Valores Normales 5 – 15 minutos.

II. **Actividad Coagulante (evaluación del tiempo de protrombina).**

- **Definición conceptual:** Esta prueba mide la actividad combinada del fibrinógeno, protrombina y los factores V, VII y X; por lo tanto, evalúa eficazmente la vía extrínseca de la formación del activador de protrombina. (63)

- **Definición operacional:**

- Naturaleza: cuantitativa
- Unidad de Medida: segundos.
- Medición: directa
- Instrumento de Medida: cronómetro
- Procedimiento: Se colocó en un tubo de ensayo el plasma ya separado; se adiciona una concentración "X" del extracto, llevar a Baño María, pasados unos segundos aproximadamente luego de ver activado el cronómetro se sacó el tubo hasta observar que se forme la red de fibrina.
- Indicador: *Tiempo de Protrombina*. No se indica en segundos sino en el porcentaje del valor normal (% de Quick). Valores Normales 10 – 14 segundos. INR: 2.4 – 2.5.

III. Actividad Hemostática.

- **Definición conceptual:** Capacidad de interrumpir in vivo el flujo de sangre. (63)
- **Definición Operacional:**
 - Naturaleza: cuantitativa
 - Unidad de Medida: minutos
 - Medición: directa
 - Instrumento de Medida: cronómetro
 - Procedimiento: herida producida en el muslo de ratones, a la que se le adiciona una concentración "X" del extracto y se mide el tiempo en que se produce la hemostasia.
 - Indicador: *Tiempo de Hemostasia*. Interrupción de la hemorragia en minutos. Valores Normales 2 – 8 minutos

IV. Toxicidad Tópica Aguda por Vía Oral.

- **Definición conceptual:** efecto nocivo de un agente tóxico, que se manifiesta en segundos, minutos, horas o días después de haber entrado en contacto con el individuo, por vía oral. (3)La toxicidad aguda se expresa de mejor manera expresando la dosis letal al 50% (DL50), es decir la dosis de droga o extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* "misk'icha", que mata 50% de los animales a los que se les administra la misma. (55)
- **Definición Operacional:**
 - Naturaleza: cualitativa
 - Unidad de Medida: muerte de ratones
 - Medición: indirecta
 - Instrumento de Medida: observación
 - Procedimiento: administrar el compuesto a los animales en una ocasión, para determinar signología y grado de letalidad. Observando los efectos nocivos

e inocuos que se manifiestan en segundos, minutos, horas o en un lapso por lo menos de 6 días al administrar en una sola ocasión diferentes dosis (mg/Kg) del extracto al animal de experimentación.

- Indicador: efecto nocivo / concentración.
- Expresión Final de la Variable:
 - *Nada:0
 - *Ligera:1
 - *Moderada:2
 - *Severa:3
 - *Muy severa:4

V. Toxicidad Aguda Tópica. (Irritación Primaria).

- **Definición conceptual:** efecto nocivo de un agente toxico, que se manifiesta en segundos, minutos, horas o días después de haber entrado en contacto con la piel del individuo. (57)
- **Definición Operacional:**
 - Naturaleza: cualitativa
 - Unidad de Medida: eritema - edema
 - Medición: indirecta
 - Instrumento de Medida: observación
 - Procedimiento: administrar el compuesto en estudio en diferentes concentraciones, embebiendo en una gasa en el dorso depilado de los animales de experimentación, seguidamente cada apósito se fija con una cinta adhesiva durante 4 horas, pasado este tiempo se quita la gasa y se evalúa el área de exposición.
 - Indicador: efecto tóxico / concentración.
 - Expresión Final de la Variable:
 - *Sin reacción:0
 - *Muy ligero:1
 - *Bien definido:2

*Moderado:3

*Severo:4

3.3.2 Variables No Implicadas.

3.3.2.1 Variables Intervinientes.

- a) De la muestra vegetal.
 - Tiempo de recolección: mes de febrero.
 - Estadio de crecimiento: Floración.
 - Altitud de recolección: 3533 msnm
 - Lugar de secado: temperatura ambiente (13°C)
- b) De la extracción.
 - Solvente y concentración del solvente: Hidroalcohólica al 70%.
 - Tipo de extracción: maceración.
 - Temperatura de maceración: temperatura ambiente (12°C)
 - Tiempo de maceración: 10 días
- c) De las personas a las que se les extrae la muestra de sangre.
 - Patologías: no tengan una enfermedad (diabetes, hipertensión). Anexo N° 5
 - Ingesta de medicamentos: no consuman medicamentos.
 - Edad: en un rango de 20 a 30 años.
 - Fisiología del sujeto: inherente a cada sujeto.
- d) De los animales de experimentación.
 - Sexo: variable de sujeto de escala nominal en macho y hembra.
 - Peso: variable de sujeto que se define como la masa que presenta cada unidad experimental. El peso promedio de los sujetos de experimentación deberá ser de 28 a 30 g.
 - Edad: variable de sujeto cuya definición es el tiempo transcurrido desde el nacimiento de la unidad experimental hasta el momento de la experimentación.
 - Lugar de crianza: los ratones fueron criados en un ambiente con ventilación adecuada y a una temperatura promedio de 20°C, manteniendo buenas prácticas de higiene.

TABLA N° 1: Resumen de operacionalización de Variables Implicadas

DEFINICIÓN OPERACIONAL		INDICADOR	NATURALEZA	ESCALA	MEDICIÓN	INSTRUMENTO DE MEDIDA	EXPRESIÓN FINAL DE LA VARIABLE	
VARIABLES IMPLICADAS	INDEPENDIENTE	Concentración del Extracto Seco Hidroalcohólico al 70% de <i>Castilleja pumila</i> (misk'icha)	Dosis administrada	Cuantitativa	De Razón	Directa	Balanza Analítica de precisión (0.0001 g de sensibilidad)	mg (de extracto) / kg (peso del animal) / mL (cantidad de sangre)
	DEPENDIENTE	Actividad Coagulante en muestras de sangre venosa	Tiempo de Coagulación	Cuantitativa	De Razón	Directa	Cronómetro	Valores Normales 5 – 15 minutos
			Tiempo de Protrombina	Cuantitativa	De Razón	Directa	Cronómetro	Valores de Referencia 10 – 14 segundos INR : 2,4 – 2,5
		Actividad Hemostática en heridas producidas en animales de experimentación	Tiempo de Hemostasia	Cuantitativa	De Razón	Directa	Cronómetro	Valores Normales 2 – 8 minutos
		Toxicidad Aguda por Via Oral en animales de experimentación.	Efecto Nocivo/ Concentración	Cualitativa	Ordinal	Indirecta	Observación	Nada: 0 Ligera:1 Moderada: 2 Severa:3 Muy Severa: 4
Toxicidad Aguda por Via Tópica (Irritación Primaria en piel) en animales de experimentación.	Efecto Tóxico/ Concentración	Cualitativa	Ordinal	Indirecta	Observación	Sin reacción: 0 Muy ligero: 1 Bien definido:2 Moderado: 3 Severo:4		

Fuente: Elaboración propia

TABLA N° 2: Resumen de la Operacionalización de variables No Implicadas

DEFINICIÓN OPERACIONAL		INDICADOR	NATURALEZA	ESCALA	MEDICIÓN	INSTRUMENTO DE MEDIDA	EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE	
VARIABLES NO IMPLICADAS	Del Animal	Edad del animal	Días de existencia	Cuantitativa	De Razón	Indirecta	Calendario	intervalo
		Peso del animal	Peso entre 25 y 30 gr.	Cuantitativa	De Razón	Directa	Balanza	gr
		Sexo del animal	Órgano genital	Cualitativa	Nominal	Directa	Vista	Hembras
	De la Muestra Vegetal	Tiempo de recolección	Mes de Junio	Cualitativa	De Razón	Directa	Calendario	meses
		Altitud de recolección	2150 – 4600 msnm	Cuantitativa	Ordinal	Indirecta	Observación	m.s.n.m.
		Estadio de crecimiento	Floración de la planta	Cualitativa	Ordinal	Indirecta	Observación	Floración
	De la Extracción	Tiempo de maceración	Variación en el color del extracto	Cuantitativa	De razón	Directa	Calendario	Días
		Temperatura de maceración	Variación en el color del extracto	Cuantitativa	De razón	Directa	Termómetro	°C
	De las personas	Edad	Días de existencia	Cuantitativa	De razón	Directa	Calendario	Años

Fuente: Elaboración propia

3.4 Criterios de Inclusión y Exclusión.

a) De la muestra vegetal.

- Criterios de inclusión.

Se recolectan todas aquellas plantas de *Castilleja pumila* "misk'icha" con hojas enteras y sanas.

- Estadio de Crecimiento: planta madura.
- Altitud de recolección: 3533 m.s.n.m.
- Temperatura de secado: temperatura ambiente.
- Condiciones de secado: bajo la sombra, en un ambiente ventilado.

- Criterios de exclusión.

Se excluirán las muestras vegetales que estén en mal estado, que hayan sufrido ataque de bacterias, hongos, plagas.

b) De los animales de experimentación.

- Criterios de inclusión.

Se incluirán ratones de la raza *Mus musculus*, con un promedio de edad de tres meses y un peso promedio de 28 a 30 g.

- Criterios de exclusión.

Se excluirán ratones de la raza *Mus musculus* enfermos; enfermos o de bajo peso.

c) De las personas a las que se les extraerá las muestras de sangre.

- Criterios de inclusión.

Se incluirán las muestras de sangre de personas voluntarias sanas con edad entre los 20 y 30 años.

- Criterios de exclusión.

Se excluirán las muestras de sangre de personas voluntarias que padezcan alguna enfermedad crónica (cardíaca, hepática y endocrina), que tomen alguna medicación, en especial AINES y anticoagulantes y también mujeres embarazadas, esto basado en la encuesta realizada. Anexo N° 5.

3.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.

La técnica empleada es la observación experimental para la recolección y el llenado de las fichas.

Instrumentos de recolección de datos; los cuales se detallan a continuación:

- ✓ Encuesta – test de selección de personas para realizar la evaluación de la actividad coagulante y hemostática, anexo N°5.
- ✓ Ficha de recolección de datos para las pruebas de solubilidad y para el Análisis Fitoquímico Cualitativo del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila “misk’icha”, anexo N°6, anexo N°7, respectivamente.
- ✓ Ficha de recolección de datos de la evaluación del Tiempo de Coagulación, anexo N°8.
- ✓ Ficha de recolección de datos de la evaluación del Tiempo de Protrombina, anexo N°9.
- ✓ Ficha de recolección de datos de la evaluación del Tiempo de Hemostasia, anexo N°10.
- ✓ Ficha de recolección de datos de la Toxicidad Aguda por Irritación Dérmica, anexo N°11.
- ✓ Ficha de recolección de datos de la Toxicidad Aguda por Vía Oral, anexo N°12.

3.6 Técnicas para el Procesamiento y Análisis de Datos.

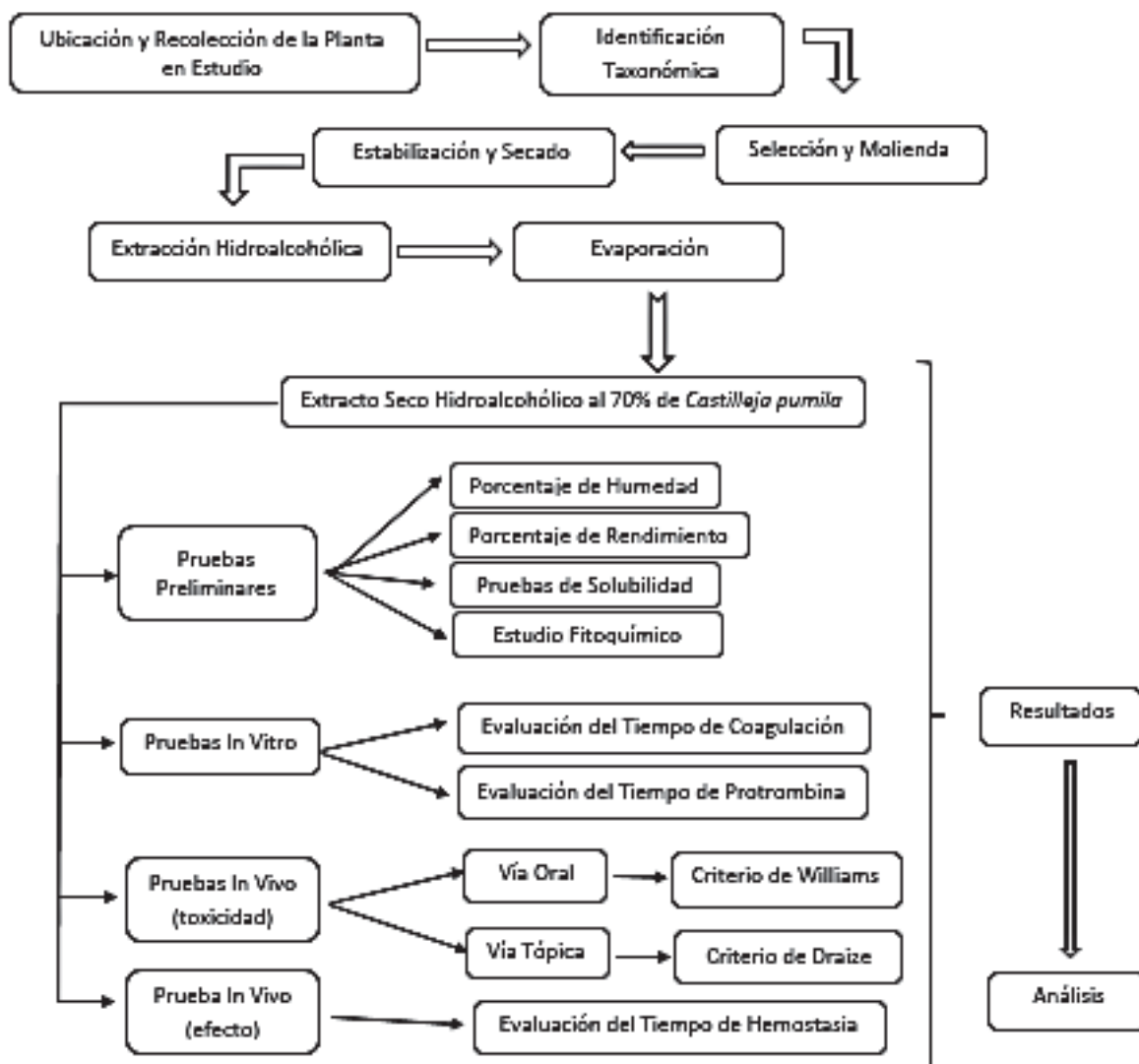
Para el procesamiento de los datos obtenidos se utilizó la prueba estadística ANOVA. Todos los datos obtenidos en la evaluación del Efecto Coagulante, hemostático, Tiempo de Protrombina, serán procesados en una base de datos creada en el paquete estadístico Statistical Package for Social Science (SPSS)

Se utilizó la técnica del análisis de varianza para comparar los tiempos de coagulación, tiempo de protrombina y hemostasia; entre los grupos de estudio.

Se encontró una diferencia en los grupos de Determinación del tiempo de sangrado por el método de Ivy - modificado, por lo que se utilizó la prueba de Duncan (prueba *post-hoc*) para determinar entre qué grupos de estudio había diferencias significativas.

3.7 Procedimientos.

FLUJOGRAMA N° 1: Flujoograma de la Investigación.



Fuente: Elaboración propia.

3.7.1 Descripción de los Procedimientos.

El primer paso para la realización de este trabajo de investigación fue la ubicación y recolección de la planta en estudio, la misma que fue colectada en bolsas de plástico agregándole etanol; para una correcta y adecuada identificación taxonómica se colecta una muestra que denote todas las características de la planta (raíz, tallo, flores), como siguiente paso se procedió a la selección de las muestras vegetales que presentaban una adecuada complejidad vegetal, posterior a esto se procede al secado en sombra, de las muestras vegetales, esto con el fin de conservar los principios activos de la planta; terminado este proceso se realiza la molienda de las muestras vegetales, esto con la finalidad de realizar un apropiado extracto hidroalcohólico para luego efectuar el proceso de maceración, el cual está determinado en que se realice por un periodo de 10 días, transcurrido este tiempo se procedió a la evaporación del macerado, para concluir con un extracto de la muestra vegetal, la fue utilizada en las pruebas de estudio.

Como primer proceso, se realizaron pruebas preliminares, las cuales fueron necesarias para determinar, por ejemplo, el porcentaje de humedad, que se efectuó pesando 5gr de la muestra vegetal fresca, colocándolas en placas Petri, para luego ponerlas a estufa a 40°C y pesarlas hasta obtener peso constante y así determinamos el porcentaje de humedad; para determinar porcentaje de rendimiento del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila "misk'icha", se calculó del peso inicial de la muestra seca y del peso final del extracto seco; para las pruebas de solubilidad, estas se realizaron tomando 10mg del extracto en diferentes tubos de ensayo para luego agregarles 10mL de solvente de diferentes polaridades y finalmente para el estudio fitoquímico también se realizaron con una cantidad considerable del extracto y realizando reacciones con distintos reactivos para la detección de metabolitos secundarios.

Para las pruebas in vitro se realizaron mediante dos evaluaciones; una de ellas fue la determinación del tiempo de coagulación, en la que se tomó como base

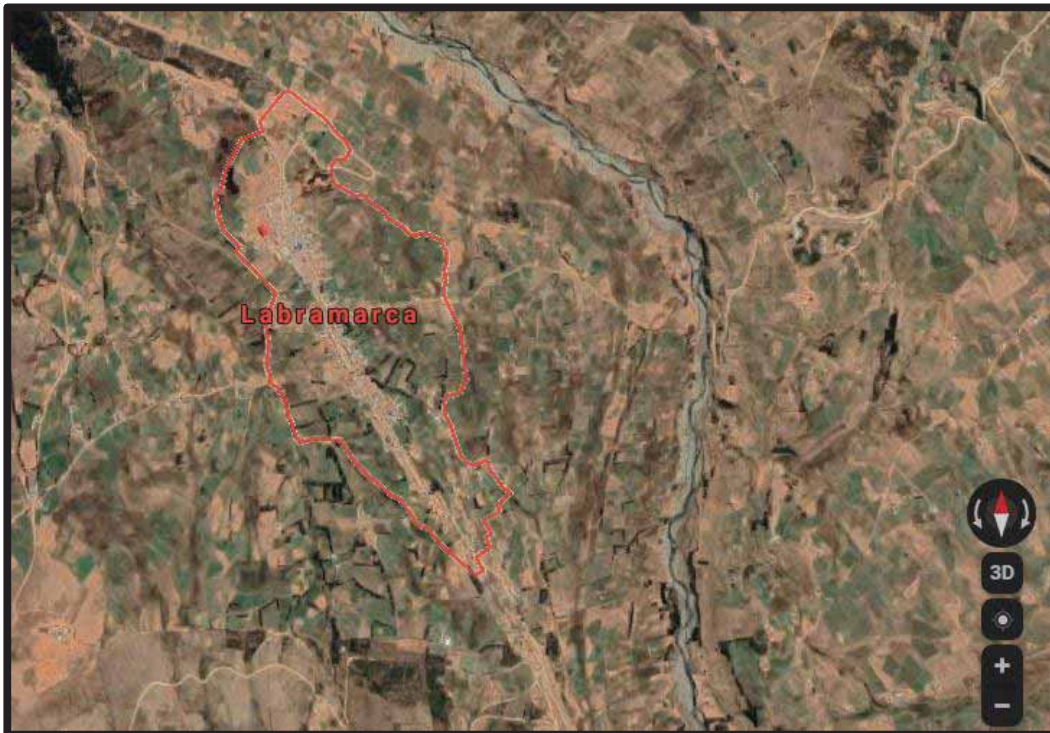
de evaluación las muestras de sangre venosa, en tubos de ensayo en baño maría, a los cuales se les añadió una dosis del extracto en estudio y así controlar el tiempo en el que se forma un coagulo; por otro lado para la determinación del tiempo de protrombina se utilizó también muestras de sangre venosa, las mismas que se llevaron a centrifugar y de ellas se trabajó solo con el plasma en tubos de ensayo a baño maría, a los cuales se les añadió las correspondientes dosis del extracto en estudio para determinar el tiempo de protrombina, este fue mediante la formación de una red de fibrina.

Por otro lado, para las pruebas in vivo una de ellas fue la determinación del tiempo de hemostasia, por el Método de Ivy modificado, el cual se trabajó en ratones y consistió en realizarles cortes en la parte del muslo, previo a esto se les administro la dosis del extracto y el patrón correspondiente y se controló el tiempo en que deja de sangrar; en este prueba se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad, por vía oral y vía tópica, para la evaluación de la toxicidad por vía oral se les administro a los ratones una dosis determinada del extracto; por otro lado para la evaluación de la toxicidad dérmica se tubo de depilar a los ratones la parte del lomo y se les coloca una gasa con la dosis correspondiente del extracto; para la evaluación de los resultados observando algunas reacciones. Finalmente, los resultados se evaluaron en un sistema de análisis de datos denominado ANOVA, de donde derivan los resultados finales y posterior análisis de ellos.

3.7.1.1 Preparación de la Muestra Vegetal.

1) Recolección de la Planta.

La planta en estudio Castilleja pumila “misk’icha”. Fue recolectada en la comunidad de Lauramarca, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, departamento del Cusco, a 3533 m.s.n.m en el mes de Abril – Mayo del 2017, en bolsas de plástico durante las primeras horas de la mañana, agregándole etanol de 96° con la finalidad de evitar la degradación de los metabolitos secundario. (65)



Lugar	LAURAMARCA
Distrito	OCONGATE
Provincia	QUISPICANCHI
Departamento	CUSCO
Ubigeo	0812100031
Viviendas	95
Habitantes	359
Longitud	-71.347870
Latitud	-13.691490

Fuente: Mapa Satelital, Internet Vía Satélite y Tecnología Electrónica.

2) Selección.

Se utilizaron las plantas sanas que no sufrieron ataque de plagas hongos o insectos o que no estuvieran marchitas o deterioradas.

3) Secado.

Las plantas seleccionadas se colocaron en pliegos de papel en un lugar sombreado y ventilado a temperatura ambiente, por un lapso de 15 días.

4) Molienda y Conservación.

Una vez que se obtuvo la muestra seca de las hojas de *Castilleja pumila* “misk’icha”, se procedió a la molienda en un molino de granos, obteniéndose una muestra triturada la cual se almacenó en frascos de vidrio color ámbar herméticamente cerrados y debidamente rotulados.

3.7.1.2 Obtención del Extracto Seco Hidroalcohólico.

Para el proceso de extracción hidroalcohólica se utilizó 200 gr de muestra seca triturada la cual se sometió a maceración en etanol al 70%, con agitación constante por un lapso de 10 días, después de los cuales se procedió al filtrado, el líquido filtrado se concentró a sequedad en Baño María a 37°C obteniéndose el extracto seco hidroalcohólico, con el cual se realizó el análisis fitoquímico y las pruebas farmacológicas.

3.7.1.3 Determinación de la Humedad.

La determinación de la humedad se realizó por triplicado en placas Petri conteniendo 5 gr de muestra, las mismas que fueron introducidas a la estufa a una temperatura de 40°C hasta la obtención de un peso constante. (66) Luego se determinó el porcentaje de humedad mediante la siguiente relación:

$$\%H = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

Dónde: %H = Porcentaje de Humedad.

M1 = Peso de Muestra Fresca.

M2 = Peso de Muestra Seca.

3.7.1.4 Determinación del Porcentaje de Rendimiento.

El porcentaje de rendimiento del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha” se calculó mediante la siguiente fórmula. (66)

$$\%E = \frac{P_f}{P_i} \times 100$$

Dónde: %E = Porcentaje de Rendimiento.
 Pf = Peso final (extracto seco)
 Pi = Peso Inicial (muestra molida)

3.7.1.5 Pruebas de Solubilidad.

Para realizar las pruebas de solubilidad se tomó aproximadamente 10mg del extracto seco hidroalcohólico de la planta en diversos tubos de ensayo de vidrio, luego se le agrego 1mL de solvente de diferente polaridad; agua destilada, etanol (40%, al 70%, 96%), acetato de etilo, acetona, éter etílico, cloroformo, hexano, etc. (67)

3.7.1.6 Análisis Fitoquímico Cualitativo.

Se realizo la marcha fitoquímica para la detección de metabolitos secundarios realizando reacciones químicas específicas de caracterización; mediante las reacciones de coloración que determinen la presencia de metabolitos secundarios del extracto seco hidroalcohólico de la especie vegetal en estudio. (67)

CUADRO N° 3: Pruebas de Análisis Fitoquímico Cualitativo.

COMPONENTES	REACTIVO
Azúcares reductores	Benedict
Glucósidos	Benedict
Alcaloides	Dragendorf
Flavonoides	Shinoda
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico

Taninos	Gelatina-sal
Saponinas	Prueba de la espuma
Quinonas	Bornträger

Fuente: Lock, O. 1994. (63)

3.7.1.7 Estudio Farmacológico.

3.7.1.7.1 Determinación de la Actividad Coagulante.

Se ha definido la actividad coagulante como la disminución en el tiempo de coagulación.

3.7.1.7.1.1 Tiempo de Coagulación por el Método de White – Modificado.

- **Fundamento Teórico:**

Se observa la formación de coágulo en tubos de vidrio en condiciones estandarizadas. El tiempo de coagulación mide el intervalo de tiempo necesario para que una muestra de sangre completa recién obtenida coagule in vitro a 37°C y evalúe en forma general el mecanismo intrínseco de coagulación. (68)

- **Protocolo Experimental:**

Para determinar la actividad coagulante del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha", sobre muestras de sangre venosa de personas voluntarias, se aplicó el método de White para evaluar el tiempo de coagulación.

Se utilizaron muestras de sangre venosa de 10 personas voluntarias que cumplieron con los criterios de inclusión, las cuales fueron seleccionadas mediante una encuesta propuesta, aplicando a las muestras de sangre obtenidas las concentraciones diferentes del extracto en estudio, la actividad coagulante será determinada aplicando el método de White modificado.

- **Procedimiento:**

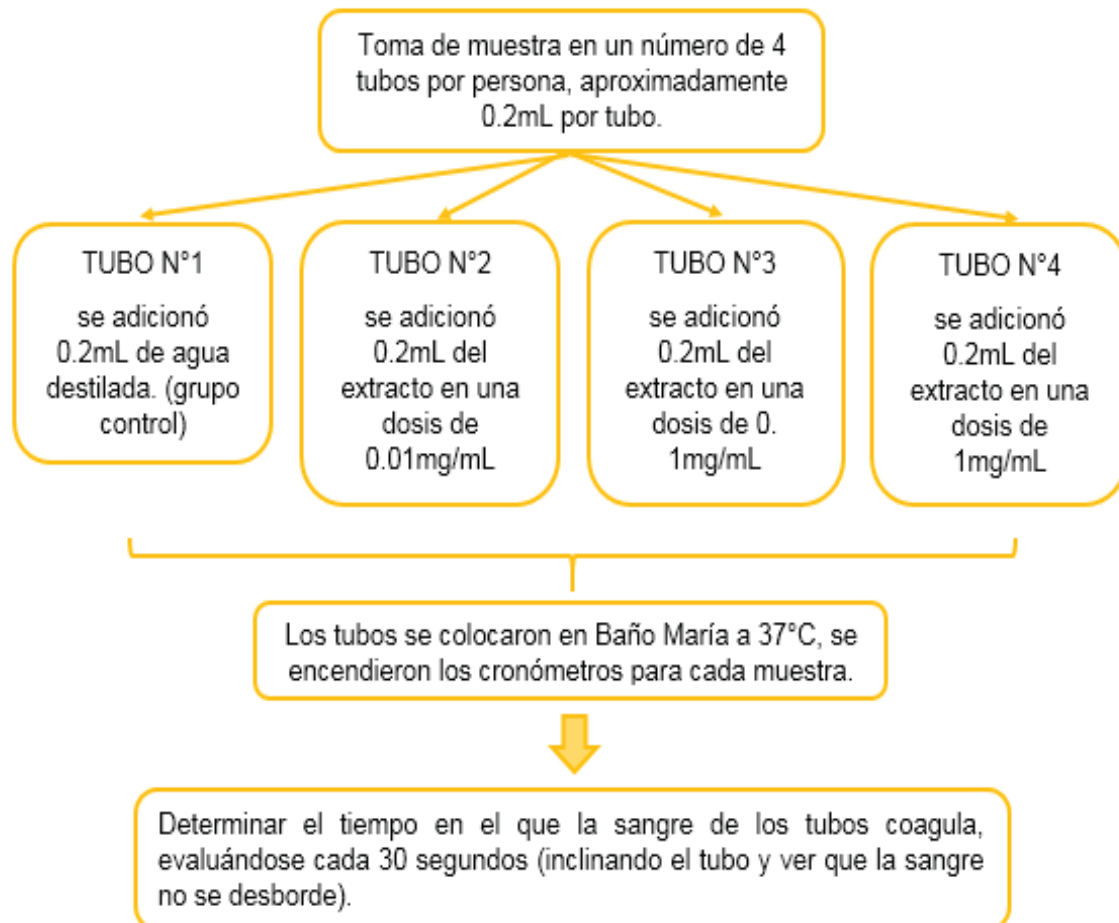
1. Se realizó la toma de muestra de sangre venosa en un número de 4 tubos por persona, aproximadamente 2mL por tubo, a los cuales se les colocó en Baño María a 37°C, se encendieron los cronómetros para cada muestra apenas entraron en contacto con el tubo de ensayo.
2. El tubo N°1 fue el control, al que se le adicionó 0.2mL de agua destilada y se colocó en Baño María una vez obtenido.
3. El tubo N°2 se le adicionó 0.2mL del extracto en una dosis de 0.01mg/mL
4. El tubo N°3 se le adicionó 0.2mL del extracto en una dosis de 0.1mg/mL
5. El tubo N°4 se le adicionó 0.2mL del extracto en una dosis de 1mg/mL.
La dosis del extracto dependió del grupo al que perteneció la muestra de sangre venosa de la persona voluntaria.
6. Seguidamente se procedió a determinar el tiempo en el que la sangre de los tubos coagula, evaluándose cada 30 segundos (inclinando el tubo y ver que la sangre no se desborde).

Tabla N° 3: Distribución de los sujetos de experimentación por grupo y concentración de extractos a probar.

CONCENTRACION DE EXTRACTOS A PROBAR		N° DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACION									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
		TIEMPO DE COAGULACIÓN (MINUTOS)									
NUMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR PERSONA	CONTROL	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1
	C1	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2
	C2	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3
	C3	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4

Fuente: Elaboración propia.

FLUJOGRAMA N°2: Procedimiento de la Determinación de la Actividad Coagulante por el Método de White-modificado.



Fuente: Elaboración propia.

3.7.1.7.1.2 Tiempo de Protrombina por el Método de Quick – Modificado.

- **Fundamento Teórico:**

Mide el tiempo que tarda en coagular una muestra de plasma, desprovisto de plaquetas y anticoagulado con citrato sódico, al ponerlo en contacto con una suspensión de tromboplastina cálcica (sustituto de la tromboplastina tisular fisiológica). La prueba de Quick, explora la vía extrínseca y común de la coagulación en las que intervienen los factores I (fibrinógeno), II (protrombina), V, VII y X. (68)

Resultado expresado como RATIO (INR): Es el cociente entre el TP del paciente y el TP teórico. Es el más útil para usar en condiciones normales.

$$R = \frac{TP_{paciente}}{TP_{teórico}} \quad \rightarrow \quad INR = R^{ISI}$$

Leyenda:

R: Índice Internacional Normalizado (INR).

TP_{paciente}: valores hallados en la prueba experimental.

TP_{teórico}: se considera el valor de 12, esto por esta en el promedio de los valores normales del Tiempo de Protrombina.

ISI: cociente de referencia, se le otorga el valor de 1.

- **Protocolo Experimental:**

Para determinar la actividad coagulante (vía extrínseca) por medio del Tiempo de Protrombina, del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”, sobre muestras de sangre venosa de personas voluntarias, se aplicó el método Coagulimétrico para evaluar el tiempo de coagulación.

Se utilizaron muestras de sangre venosa de 10 personas voluntarias que cumplieron con los criterios de inclusión, las cuales fueron seleccionadas mediante una encuesta propuesta y tomando en cuenta los criterios de exclusión e inclusión, aplicando a las muestras de sangre obtenidas las concentraciones diferentes del extracto en estudio.

- **Procedimiento:**

A) TOMA DE LA MUESTRA:

1. Se realizó la toma de muestra de sangre venosa en un tubo Vacutainer que contiene citrato de sodio.
2. Se llevó a centrifugar las muestras de sangre y se separó el plasma.

B) PREPARACIÓN DEL REACTIVO (SOLUPLASTIN):

1. Se procedió a abrir el vial quitando el precinto metálico y retirando lentamente el tapón de goma para evitar pérdidas del material.
2. Agregar un volumen de 2mL de agua bidestilada al vial, tapar y dejar reposar, para luego homogenizar la solución de manera suave, hasta obtener una solución homogénea.

C) PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

1. Teniendo la muestra de sangre venosa ya centrifugada; separación del plasma; se procede a trabajar.
2. En un tubo se colocó el reactivo de Tromboplastina (SOLUPLASTIN) (200 μ L).
3. Este tubo se llevó a baño María a 37° C por 3 minutos.
4. Transcurrido este tiempo, en este tubo ya rotulado previamente, se añadió el plasma (100 μ L) y se activó el cronometro y se procedió a mezclar sin sacar del baño María.

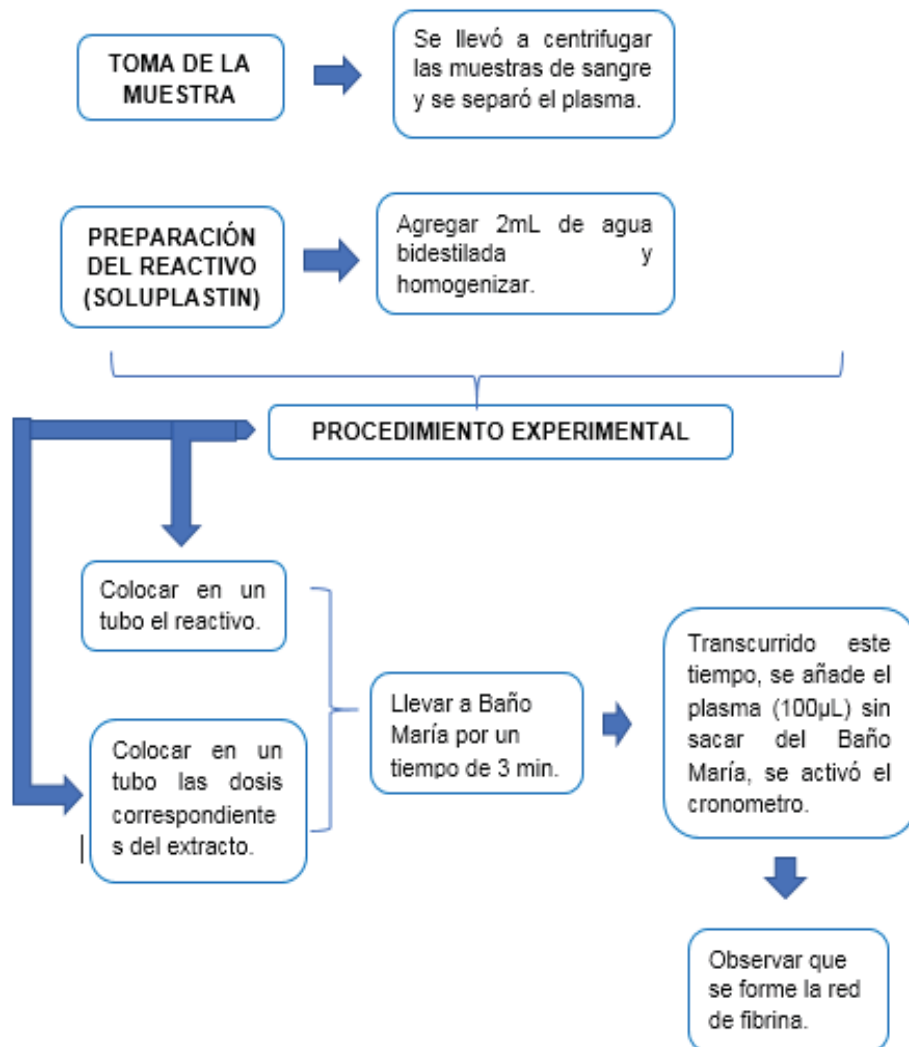
5. Pasado unos segundos aproximadamente luego de haber activado el cronómetro se sacó el tubo hasta observar que se forme la red de fibrina.
6. El intervalo de tiempo transcurrido desde que se añade el plasma hasta que se formen los filamentos de fibrina, será interpretado como el "Tiempo de Protrombina" y será considerado como nuestro tiempo control.
7. Para trabajar las distintas concentraciones, en un tubo de ensayo se añadió el extracto en cantidad de 0.2 mL; de acuerdo a las concentraciones establecidas; y posterior a esto se adicionó el plasma (100µL), todo este proceso en Baño María; una vez el plasma entra en contacto con el extracto, se activó el cronómetro y se procedió a mezclar sin sacar del baño María, hasta observar que se forme una red de fibrina y se toma nota del tiempo establecido.

Tabla N° 4: Distribución de los sujetos de experimentación por grupo y concentración de extractos a probar.

CONCENTRACION DE EXTRACTOS A PROBAR		N° DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACION									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
		TIEMPO DE PROTROMBINA (INR)									
NUMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR PERSONA	CONTROL	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1	T 1
	C1	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2	T 2
	C2	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3	T 3
	C3	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4	T 4

Fuente: Elaboración propia.

FLUJOGRAMA N°3: Procedimiento de la Determinación del Tiempo de Protrombina por el Método de Quick-modificado.



Fuente: Elaboración propia.

3.7.1.7.2 Determinación de la Actividad Hemostática.

Se ha definido la actividad hemostática como la disminución del porcentaje del tiempo de hemostasia en heridas producidas en ratones albinos.

3.7.1.7.2.1 Tiempo de Hemostasia por el Método de Ivy – Modificado.

- **Fundamento Teórico:**

Mediante esta prueba se estudia la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular y su capacidad para formar el trombo plaquetario que detiene la hemorragia a nivel de un vaso de pequeño calibre. Consiste, por tanto, en realizar una pequeña herida y medir el tiempo en que tarde en sangrar. (68)

- **Protocolo Experimental:**

Se utilizaron 50 ratones con un peso dentro del rango de 28gr – 30gr, procedentes de los criaderos del Instituto Nacional de Salud, a los cuales se les agrupó en 5 grupos de 10 ratones. Para determinar la actividad Hemostática se aplicó el Método “Tiempo de Sangrado de Ivy Modificado”.

- **Procedimiento:**

1. Se depilaron a los ratones en la parte del muslo derecho.
2. Se realizó una incisión de 1mm de profundidad y 1cm de longitud en la zona depilada, con una hoja de bisturí N°22.
3. Al momento de producirse la hemorragia se puso en marcha el cronómetro.
4. Al primer grupo no se le aplicó ninguna sustancia, constituyéndose este, en el grupo control, para determinar el tiempo de hemostasia normal.
5. Al segundo grupo se le aplicó el extracto en una dosis de 10mg/Kg.
6. Al tercer grupo se le aplicó el extracto en una dosis de 100mg/Kg.
7. Al cuarto grupo se le aplicó el extracto en una dosis de 1000mg/Kg.

8. Al quinto grupo se aplicó Acido Tranexámico; en una dosis de 1000mg/Kg, este fue el grupo patrón.

9. La vía de administración utilizada fue por vía intradérmica.

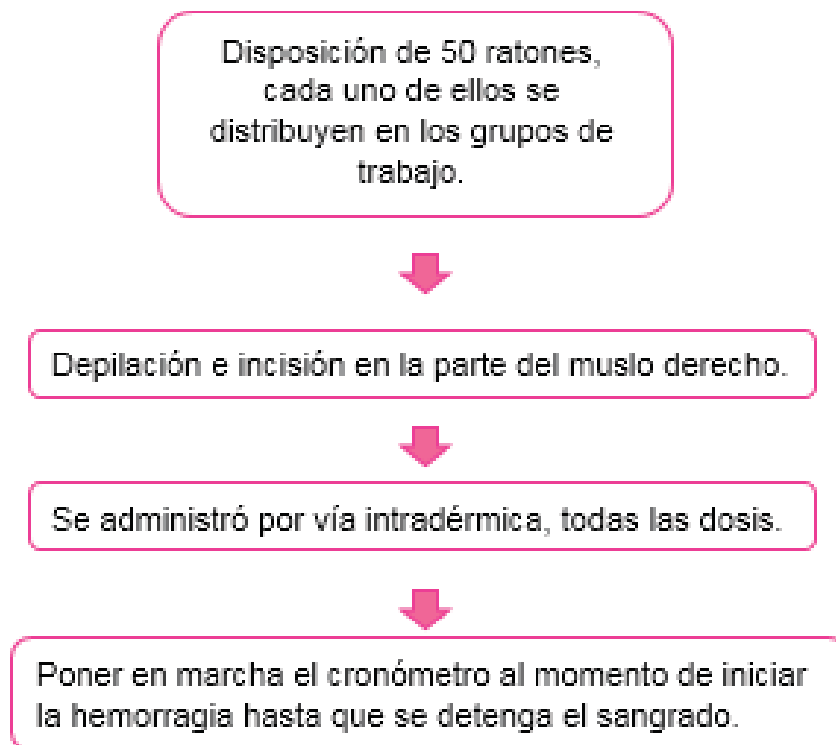
10. Se tomó el tiempo transcurrido para que cada herida deje de sangrar.

Tabla N° 5: Distribución de sujetos de experimentación por grupos y aplicación de las concentraciones del extracto.

N° DE GRUPO	N° DE SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO A APLICAR.
1	10	CONTROL
2	10	C1
3	10	C2
4	10	C3
5	10	PATRÓN

Fuente: Elaboración Propia.

FLUJOGRAMA N°4: Procedimiento de la Determinación de la Actividad Hemostática por el Método de Ivy-modificado.



Fuente: Elaboración propia.

3.7.1.7.3 Determinación de la Toxicidad.

3.7.1.7.3.1 Criterio de Draize para la Toxicidad Aguda Tópica (Irritación Primaria en Piel).

- **Fundamento Teórico:**

El ensayo de irritación dérmica se basa en la aplicación de una sustancia, ya sea líquida o sólida, en una pequeña área de la piel de un mamífero. Se utiliza para medir la irritación mediante la observación de los daños que causa una sustancia en la piel de los animales. (69)

Después del tiempo de aplicación, generalmente 4 horas, se valora la aparición de eritema o edema en la zona tratada.

- **Protocolo Experimental:**

Se tomaron 24 ratones divididos en cuatro grupos de 6 cada uno, a los cuales se les aplicó las diferentes dosis del extracto en estudio, mediante parches, cada grupo será dividido en dos subgrupos: Subgrupo A y Subgrupo B.

Para las dosis utilizadas en los parches, esta se obtuvo por antecedentes de estudio, cito en la tesis, "Toxicidad Aguda Tópica e Irritabilidad Dérmica de la Decocción de hojas de *Piper auritum kunth* (caisimón de anís), Cuba - 2014"

- **Procedimiento:**

1. A los ratones se les depiló la parte del dorso en un área de 3cm².
2. A los ratones del subgrupo A (3 ratones) se les realizó una abrasión en la zona de la piel depilada (es decir se les realizó pequeñas incisiones en la capa superficial de las células de manera que estas incisiones no sean lo suficientemente profundas como para afectar la dermis o producir salidas de sangre). Y a los ratones del subgrupo B (3 ratones) no se les realizó nada.
3. Se pesó el extracto en valores de 1gr, 3gr y 5gr y estos se aforaron en agua destilada a 100mL.

4. Al primer grupo de ratones se les aplicó una dosis de 0.5mL de agua destilada, ya que este grupo se constituyó en el grupo control.
5. Al segundo grupo se le aplicó el extracto en la dosis de C1=1gr.
6. Al tercer grupo se le aplicó el extracto en la dosis de C2= 3gr
7. Al cuarto grupo se le aplicó el extracto en la dosis de C3= 5gr
8. En todos los casos se aplicó 0.5mL del extracto, el cual fue colocado en una gasa de 2cm² que se mantuvo fija sobre el área afectada de la piel.
9. Seguidamente se envolvieron con un esparadrappo no absorbente, al cabo de 1 hora de exposición se procedió a retirar la gasa cuidadosamente y observar alguna reacción de edema o eritema.
10. Al cabo de las 4 horas de removido el parche, se evaluó el área afectada, repitiéndose dicha evaluación a las 24, 48 y 72 horas después.

Tabla N° 6: Distribución de los sujetos en estudio por grupos y concentración del extracto en estudio a utilizar.

N° DE GRUPO	N° DE SUBGRUPO	N° DE RATONES	CONCENTRACIÓN A UTILIZAR
GRUPO N° 1	Subgrupo 1a	3 ratones	CONTROL
	Subgrupo 1b	3 ratones	
GRUPO N° 2	Subgrupo 2a	3 ratones	C1
	Subgrupo 2b	3 ratones	
GRUPO N° 3	Subgrupo 3a	3 ratones	C2
	Subgrupo 3b	3 ratones	
GRUPO N° 4	Subgrupo 4a	3 ratones	C3
	Subgrupo 4b	3 ratones	

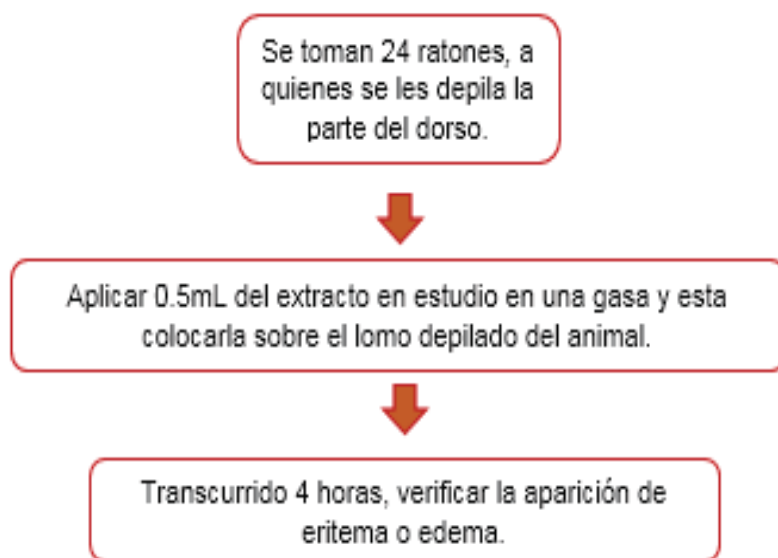
Fuente: Elaboración propia.

Cuadro N° 4: Criterios de evaluación de la severidad de la irritación dérmica primaria individual.

GRADO DE LESIÓN	ERITEMA	EDEMA	VESICULA
0: sin reacción	No eritema	No edema	No vesícula
1: muy ligero	Eritema leve color rosado	Edema muy poco perceptible	Micro vesículas 1mm
2: bien definido	Eritema bien definido, color rojo suave	Edema leve, bordes del área bien definidos por levantamiento definido.	Vesícula 1mm y 1cm
3: moderado	Eritema moderado, color rojo definido, prurito	Edema moderado, levantamiento de 1 mm aproximado	Ampolla 1cm
4: severo	Eritema marcado, rojo intenso, prurito.	Edema muy marcado	Exulceración y costra

Fuente: Elaboración Propia, de acuerdo a la información recopilada (Drize J. -1945)

**FLUJOGRAMA N°5: Procedimiento de la Determinación de la Toxicidad
Dérmica (Irritación Primaria en Piel) bajo el Criterio de Draize.**



Fuente: Elaboración propia.

3.7.1.7.3.2 Toxicidad Oral por el Método de Lorke.

- **Fundamento Teórico:** El método de Lorke describe un método para la investigación de la toxicidad aguda de una sustancia desconocida, con la determinación de la DL50. Usando este método es posible obtener con un mínimo número de animales de experimentación información adecuada de la toxicidad aguda y de la DL50.

- **Protocolo Experimental:**

Se trabajó con 16 ratones, con un peso de 25gr a 30gr, acondicionados en los ambientes de laboratorio, para lo cual se conformaron dos fases, en la primera fase se utilizó 3 ratones por 4 grupos (3 experimentales y 1 control), en la segunda fase se utilizó 4 ratones uno por cada grupo de acuerdo a los resultados de la primera fase.

PRIMERA FASE: Los tres grupos de pre prueba estarán formados por 3 animales de experimentación según la tabla del método de Lorke.

SEGUNDA FASE: Los resultados de la primera fase fueron utilizados para determinar las nuevas dosis en el segundo test en el que cada grupo está formado por un único ratón.

- **Procedimiento:**

1. Se sometió a los ratones en ayuno de 24 horas.
2. Se les administró las diferentes concentraciones del extracto por vía oral, mediante una cánula orofaríngea.
3. Después de la administración de los extractos, se observó al ratón durante las 24 horas; donde se observaron ojos, piel, mucosas, y también se tuvo en cuenta algunos otros signos como piloerección, somnolencia, diarrea, temblores, así mismo se tomaron en cuenta ciertos comportamiento tales como: irritabilidad, agresividad, intranquilidad.

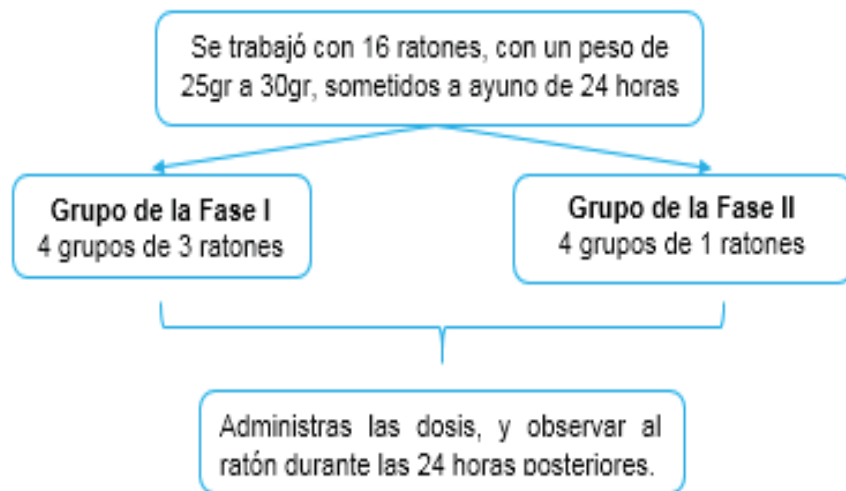
4. Para la segunda fase se utilizó un ratón por grupo, el cual también fue observado durante 24 horas, también se examinaron los aspectos antes mencionados.

CUADRO N° 5: Toxicidad aguda por el Método de Lorke
fase I y fase II

FASES	GRUPO	N° DE ANIMALES	DOSIS mg/kg
I	1	3	control
	2	3	C1
	3	3	C2
	4	3	C3
II	1	1	Control
	2	1	C1
	3	1	C2
	4	1	C3

Fuente: Elaboración Propia, de acuerdo a la información recopilada (Lorke Dietrich-1994)

FLUJOGRAMA N°6: Procedimiento de la Determinación de la Toxicidad Aguda Oral bajo el Método de Lorke.



Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Ensayos Preliminares.

4.1.1 Determinación de Porcentaje de Humedad de la planta *Castilleja pumila* “misk’icha”.

La determinación del porcentaje de humedad de la muestra nos permite saber la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una estufa.

TABLA N° 7: Porcentaje de humedad de la planta de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Muestra	Placa N°	Peso de la muestra fresca (gr)	Peso de la muestra seca (gr)	Porcentaje de Humedad (%)	Promedio (%)
Planta de <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha” (tallos, hojas, flores)	1	5	0.924	81.52	80.62
	2	5	0.9885	80.23	
	3	5	0.9935	80.13	

Fuente: Datos experimentales.

Análisis, interpretación y discusión de resultados.

La tabla N° 7 muestra el porcentaje de humedad de la planta de *Castilleja pumila* “misk’icha” que es de 80.62% (muestra por triplicado), este manifiesta un porcentaje alto de humedad, por lo tanto, el secado y la conservación de esta especie en estudio se debe manejar con mucho cuidado, corriendo el riesgo de que se produzca hidrólisis, oxidación o deshidrogenación. (70)

El proceso de deshidratación a 40°C, permite disminuir el agua libre presente en la muestra vegetal de estudio de *Castilleja pumila* “misk’icha”, este proceso

de secado tiene un rol importante en interrumpir los procesos de degradación de metabolitos catalizados por enzimas, lo que evita un crecimiento microbiano y micótico, responsables de la descomposición y alteración de metabolitos presentes en la muestra vegetal. (70)

4.1.2 Determinación de Porcentaje de Rendimiento del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

TABLA N° 8: Porcentaje de rendimiento del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Muestra	Peso de la muestra fresca (g)	Peso de la muestra seca (g)	Promedio (%)
Planta de <i>Castilleja pumila</i> “misk’icha” (tallos, hojas, flores) molida	10.12 gr	2.371gr	23.42%

Fuente: Datos experimentales.

Análisis, interpretación y discusión de resultados.

En la tabla N° 8 se muestra el resultado del porcentaje de extracción obtenida por maceración de la planta de *Castilleja pumila* “misk’icha” en etanol al 70%, obteniéndose un valor de 23.42% lo que indica que se necesitó una considerable cantidad de la planta para obtener un buen porcentaje de extracto. El porcentaje de rendimiento permite determinar la cantidad de muestra necesaria para la realización de investigaciones con extracto de la especie vegetal.

4.1.3 Pruebas de Solubilidad del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Al realizar las pruebas de solubilidad del extracto seco Hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 9: Solubilidad del extracto seco hidroalcohólico al 70% DE *Castilleja pumila* “misk’icha”.

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Agua	++
Etanol 40%	++
Etanol 70%	++
Etanol 90%	+
Acetona	+
Cloroformo	-
Hexano	-

Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

Signos	Significado
+++	Muy Soluble
++	Soluble
+	Medianamente Soluble
--	Insoluble

Análisis, interpretación y discusión de resultados.

Para esta prueba se utilizó una cantidad considerable del extracto en tubos de ensayo a los cuales se les añade aproximadamente 3 mL de los solventes, este se agita, si el compuesto es soluble debe desaparecer gradualmente. De las pruebas de solubilidad del extracto seco hidroalcohólico se evidencia que es soluble en solventes polares como el agua, el alcohol al 40% y el etanol al 70%; medianamente soluble en etanol al 90% y acetona e insoluble en solventes apolares como el cloroformo y hexano. Siendo que el extracto no fue soluble completamente en ningún solvente utilizado.

Esto nos indica que la planta de *Castilleja pumila* “misk’icha” presenta mayor concentración de metabolitos de alta polaridad.

4.1.4 Determinación del Análisis Fitoquímico Cualitativo del extracto seco hidroalcohólico al 70% *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Al realizar el análisis fitoquímico del extracto seco hidroalcohólico se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 10: Análisis Fitoquímico Cualitativo del Extracto seco Hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO		
METABOLITO SECUNDARIO	REACTIVO	CANTIDAD DE METABOLITO SECUNDARIO PRESENTE EN EXTRACTO
ALCALOIDES	Dragendorff	--
LACTONAS	Baljet	+
FLAVONOIDES	Shinoda	+++
TANINOS	Gelatina - sal	--
COMPUESTOS FENOLICOS	Cloruro férrico	++

AZUCARES REDUCTORES	Benedict // Fehling	+
GLICÓSIDOS	Fehling // Benedict	+
AMINOÁCIDOS	Ninhidrina	++
SAPONINAS	Prueba de la Espuma	+
ESTEROIDE	Acetato de cobre Lieberman Burchard	+
QUINONAS	Borntrager	+++

Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

Signos	Significado
+++	Abundante cantidad del metabolito
++	Regular cantidad del metabolito
+	Poca cantidad del metabolito
--	Ausencia del metabolito

Análisis, interpretación y discusión de resultados.

En relación con la tabla N°10 se muestran los resultados realizados del análisis fitoquímico cualitativo para la determinación de metabolitos secundarios del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila "misk'icha"; este se basó en resultados obtenidos mediante pruebas colorimétricas y de precipitación para cada metabolito a determinar. Por ende, se valoró la presencia de abundante cantidad de metabolitos como quinonas, que dieron una coloración roja con hidróxido de potasio, para los flavonoides se realizó la reacción de Shinoda que trabaja con ácido clorhídrico concentrado dando una coloración rojo cereza, indicando una reacción positiva.

Así como regular cantidad de metabolitos secundarios, tales como aminoácidos en la que se trabajó con la prueba de ninhidrina dando como resultado una coloración rojiza, y compuestos fenólicos, que dieron como reacción positiva la presencia de precipitado o coloración azul-verdosas.

Para las otras pruebas se ha observado que no es notable la presencia de ciertos compuestos como: saponinas, azúcares reductores, glicósidos, lactonas y una presencia nula de metabolitos tales como: alcaloides y taninos. Con los resultados se contribuye al conocimiento fitoquímico de esta especie.

Como metabolito secundario presente en abundante cantidad está la quinona, que sería el responsable de la actividad coagulante, ya que ejerce una actividad biológica relevante, siendo un ejemplo de ello la vitamina K1, que es un factor importante en la coagulación sanguínea ya que interviene en la síntesis de protrombina y la coenzima Q, una quinona que interviene en la cadena de transporte de electrones en las células. (71)

4.2 Prueba de la Actividad Coagulante In Vitro.

4.2.1 Evaluación del Tiempo de Coagulación por el Método de White-Modificado.

TABLA N° 11: Resultados de la evaluación de la actividad coagulante in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en muestras de sangre venosa.

	CONCENTRACION DE EXTRACTOS A PROBAR	N° DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACION									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
		TIEMPO DE COAGULACION (MINUTOS)									
NUMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR PERSONA	C3	6'13"	7'07"	7'25"	8'06"	8'15"	8'22"	9'10"	9'13"	10'08"	10'24"
	C2	6'15"	7'11"	7'29"	8'12"	8'19"	8'26"	9'15"	9'19"	10'12"	10'28"
	C1	6'22"	7'13"	7'33"	8'21"	8'24"	8'31"	9'23"	9'25"	10'18"	10'36"
	CONTROL	6'32"	7'22"	7'39"	8'29"	8'32"	8'39"	9'35"	9'38"	10'24"	10'48"

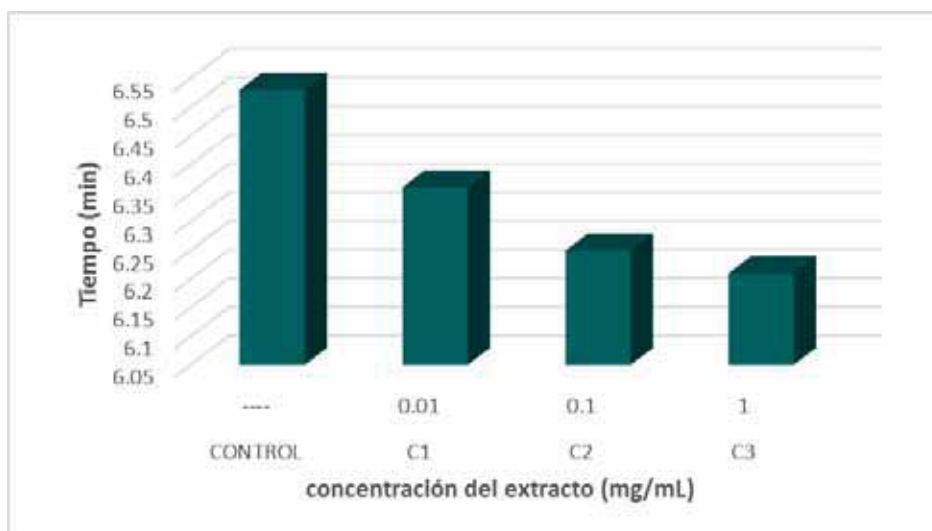
Fuente: Datos experimentales.

Tabla N° 12: Disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en muestras de sangre venosa.

Grupos	Concentración del extracto (mg/mL)	Disminución de tiempo de coagulación (minutos)	Porcentaje (%)
CONTROL	----	6.53	6.27
C1	0.01	6.36	
C2	0.1	6.25	
C3	1	6.21	

Fuente: Datos experimentales.

Gráfico N°1: Disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en muestras de sangre venosa.



Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

- C1: Concentración 1
- C2: Concentración 2
- C3: Concentración 3

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

En la tabla N° 11 se observa una disminución del tiempo de coagulación en minutos en las muestras de sangre venosa al trabajar las diferentes concentraciones del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”, así se puede apreciar que a la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de coagulación de 6.36 min.; en el caso de la dosis 2 (C2=0.1mg/mL) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de coagulación de 6.25 min.; por último, en la dosis 3 (C3=1mg/mL) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de coagulación de 6.21 min.

Por lo que se puede determinar que a la dosis de concentración 3, (C3=1mg/mL), se observa y constituye una dosis adecuada con la que se obtuvo un mejor promedio en cuanto a la disminución del tiempo de coagulación.

Respecto a los valores obtenidos podemos decir que se encuentran en un promedio de 6.27 min. del tiempo de coagulación, basados en la referencia de los valores normales del tiempo de coagulación que nos brinda el Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología del Instituto Nacional de Salud; que nos muestra un tiempo de 5 – 15 min.

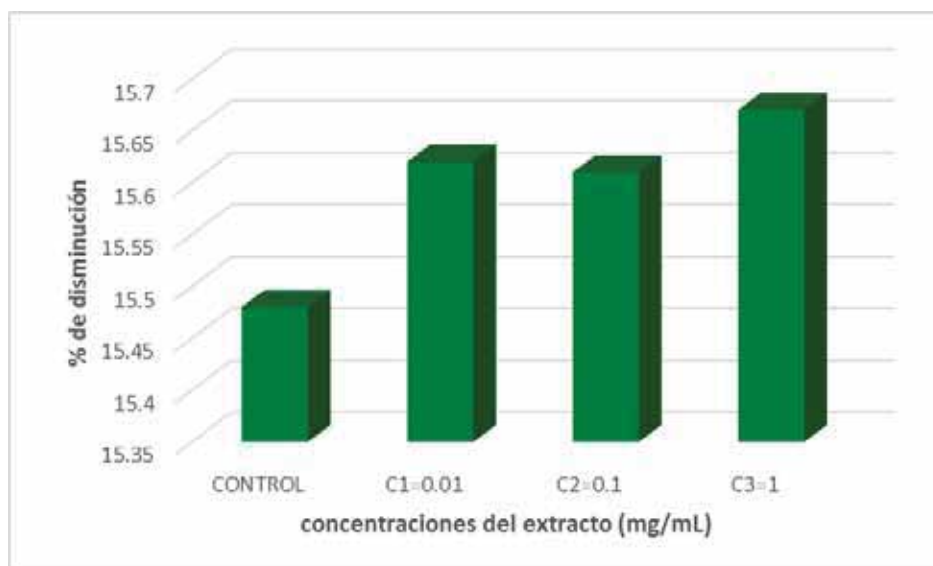
Basados en el estudio con el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Lepidium chichiraca* (Desvaux) “chichira” realizado en el año 2005; se evidencia que a la dosis con las que se realizó el trabajo de investigación, la que de mejor manera concluyo con los resultados fue a dosis de (0.6mg/mL) en un tiempo de 1.591 minutos; así entonces podemos precisar que a las dosis y concentraciones usadas en ambos estudios, estas se encuentran dentro del rango del tiempo normal de coagulación.

Tabla N°13: Porcentaje de disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en muestras de sangre venosa.

Grupos	Concentración del extracto (mg/mL)	Porcentaje de disminución de tiempo de coagulación (%)	Porcentaje %
CONTROL	---	15.48	15.63
C1	0.01	15.62	
C2	0.1	15.61	
C3	1	15.67	

Fuente: Datos experimentales.

Gráfico N° 2 Porcentaje de disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en muestras de sangre venosa.



Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

- C1: Concentración 1
- C2: Concentración 2
- C3: Concentración 3

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

Para la tabla N° 13 se observa un porcentaje de disminución del tiempo de coagulación con las dosis utilizadas, aquí podemos observar un porcentaje de forma creciente partiendo de la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) con un porcentaje de 15.62%, hasta llegar a la dosis 3 (C3=1mg/mL) presentando un porcentaje de 15.67%, pudiendo apreciar que a esta concentración el porcentaje de disminución del tiempo de coagulación es mayor, aunque la diferencia es por los decimales en comparación con las otras concentraciones.

En el estudio realizado con el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Lepidium chichiraca* (Desvaux) “chichira” realizado el año 2005; se evidenció el promedio, de las dosis utilizadas en este estudio, las cuales fueron (0.1; 0.3; 0.6 mg/mL), respecto a un valor porcentual de un 17.86% y en relación con el promedio del porcentaje obtenido con el extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en un 15.63%; bajo esta proposición, en ambos estudios que determinan el tiempo de coagulación, podemos decir que ambas especies presentan un valor porcentual aproximadamente igual, en cuanto a la disminución del tiempo de coagulación, ya que las dosis a las cuales ambos extractos se trabajaron son similares.

- **Análisis estadístico de la actividad coagulante in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en muestras de sangre venosa.**

Tabla N°14: Análisis de varianza de la disminución del tiempo de coagulación in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en muestras de sangre venosa.

ANOVA					
TIEMPO DE COAGULACIÓN					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2149,800	3	716,600	,111	,953
Dentro de grupos	232102,600	36	6447,294		
Total	234252,400	39			

Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

gl: grados de libertad

f: distribución de Fisher (razón)

Sig: significancia comparada (p)

Si $p > 0.05$ = No existe diferencia significativa.

Si $p < 0.05$ = Si existe diferencia significativa.

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

Como el valor de Sig=0,953 es mucho mayor que el nivel de significancia de 0,05 se afirma que no existe diferencia significativa entre las disminuciones del tiempo de coagulación a las diferentes dosis del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Esto podría estar atribuido a las concentraciones a las cuales se trabajó con el extracto, además que esta prueba se realizó en un tiempo determinado de estudio por lo que no se realizó ningún tratamiento o prueba después de verificar el tiempo de coagulación de las muestras de sangre venosa a baño maría.

4.2.2 Evaluación del Tiempo de Protrombina en plasma por el Método de Quick-Modificado.

TABLA N° 15: Resultados de la evaluación de la actividad del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en plasma.

	CONCENTRACION DE EXTRACTOS A PROBAR	N° DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACIÓN									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
		TIEMPO DE PROTROMBINA (SEGUNDOS)									
NUMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR PERSONA	C3	11"30	11"42	12"26	12"35	12"56	13"20	13"42	13"60	14"10	14"36
	C2	11"36	11"38	12"30	12"42	12"64	13"30	13"58	13"66	14"27	14"40
	C1	11"52	11"62	12"38	12"58	12"80	13"54	13"76	13"70	14"43	14"54
	CONTROL	11"80	12"12	12"44	12"86	13"08	13"66	13"75	13"88	14"56	14"63

Fuente: Datos experimentales.

TABLA N° 16: Resultados de la evaluación de la actividad del tiempo de protrombina desarrollados en valores de INR.

	CONCENTRACION DE EXTRACTOS A PROBAR	N° DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACIÓN									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
		TIEMPO DE PROTROMBINA EN INR									
NUMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR PERSONA	C3	0.81	0.82	0.88	0.89	0.90	0.95	0.96	0.98	1.01	1.03
	C2	0.87	0.88	0.95	0.96	0.97	1.02	1.05	1.05	1.10	1.11
	C1	0.88	0.88	0.94	0.96	0.97	1.03	1.05	1.04	1.10	1.11
	CONTROL	0.88	0.91	0.93	0.96	0.98	1.02	1.03	1.04	1.09	1.10

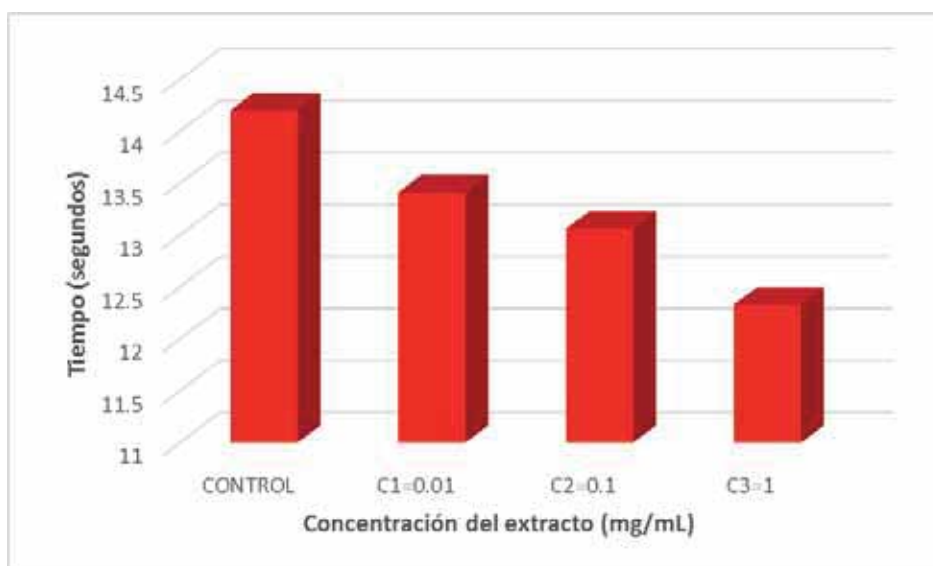
Fuente: Datos experimentales.

Tabla N° 17: Disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en Plasma.

Grupos	Concentración del extracto (mg/mL)	Disminución de tiempo de protrombina (segundos)	Porcentaje (%)
CONTROL	0.2	14.20	12.93
C1	0.01	13.41	
C2	0.1	13.06	
C3	1	12.33	

Fuente: Datos experimentales.

Gráfico N° 3: Disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en Plasma.



Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

C1: Concentración 1

C2: Concentración 2

C3: Concentración 3

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

En la tabla N° 16 se observa una disminución del tiempo de protrombina al trabajar las diferentes concentraciones del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha” en plasma, así se puede apreciar que a la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de protrombina de 13.41 seg.; en el caso de la dosis 2 (C2=0.1mg/mL) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de protrombina de 13.06 seg.; por último, en la dosis 3 (C3=1mg/mL) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de protrombina de 12.33 seg.

Por lo que se puede determinar que a la dosis 3 de concentración C3=1mg/mL, se observa y constituye una dosis adecuada con la que se obtuvo un mejor promedio respecto a la disminución del tiempo de protrombina en plasma.

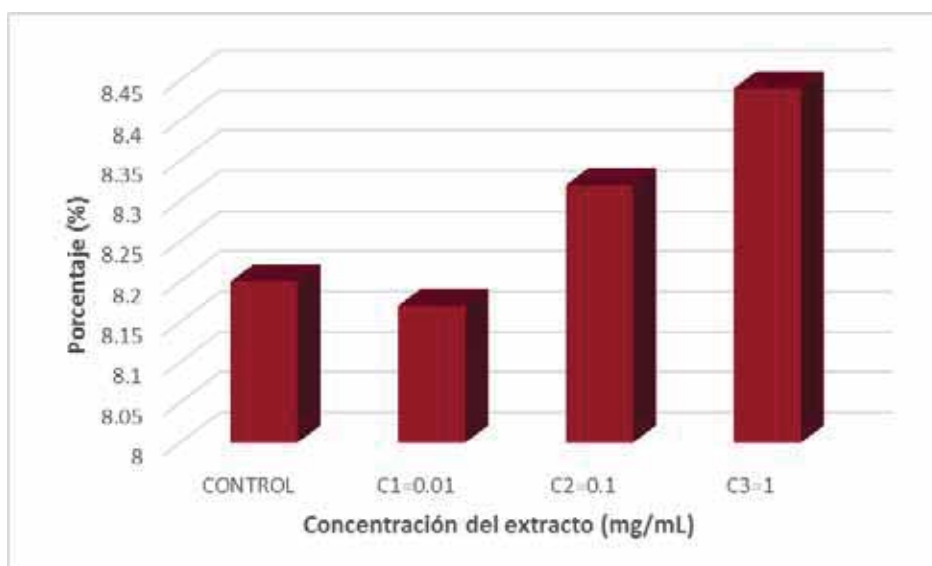
Por definición el tiempo de Protrombina mide el tiempo que tarda en coagular una muestra de plasma, desprovisto de plaquetas y anticoagulado con citrato sódico; este tiempo es expresado en segundos; y bajo la referencia de los valores normales del tiempo de protrombina que nos brinda el Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología del Instituto Nacional de Salud (72); que nos muestra un tiempo de 12 – 14 seg.; en comparación con los valores obtenidos en nuestro estudio, estos se encuentran dentro del rango del tiempo de protrombina, en un promedio de 12.93 seg. por lo tanto, esto nos indica que la disminución del tiempo de protrombina dependerá de la concentración del extracto que está en relación con la tromboplastina y el hematocrito.

Tabla N°18: Porcentaje de disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en Plasma.

Grupos	Concentración del extracto (mg/mL)	Porcentaje de disminución de tiempo de protrombina (%)	Porcentaje (%)
CONTROL	0.2	8.20	
C1	0.01	8.17	8.31
C2	0.1	8.32	
C3	1	8.44	

Fuente: Datos experimentales.

Gráfico N° 4: Porcentaje de disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en Plasma.



Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

C1: Concentración 1

C2: Concentración 2

C3: Concentración 3

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

Para la tabla N° 18 se observa un porcentaje de disminución del tiempo de protrombina con las dosis utilizadas, aquí podemos observar que a la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) presenta un porcentaje de 8.17%, a la dosis 2 (C2=0.1mg/mL) presenta un porcentaje de 8.32% hasta llegar a la dosis 3 (C3=1mg/mL); presentando un porcentaje de 8.44%; a esta concentración el porcentaje de disminución del tiempo de protrombina en plasma es mayor, y en comparación con el porcentaje de disminución del tiempo de protrombina de nuestro control este se encuentra dentro del rango de las concentraciones de las dosis utilizadas, esto podría interpretarse como una acción similar respecto a la planta en estudio y nuestro patrón, en quienes evaluamos la capacidad que

tiene la sangre para coagular, es decir, el tiempo necesario para detener una hemorragia.

- **Análisis estadístico de la actividad del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en plasma.**

Tabla N° 16: Análisis de varianza de la disminución del tiempo de protrombina in vitro con la adición del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en Plasma.

ANOVA					
TIEMPO DE PROTROMBINA EN INR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,039	3	,013	2,078	,120
Dentro de grupos	,227	36	,006		
Total	,266	39			

Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

gl: grados de libertad

f: distribución de Fisher (razón)

Sig: significancia comparada (p)

Si $p > 0.05$ = No existe diferencia significativa.

Si $p < 0.05$ = Si existe diferencia significativa.

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

Como el valor de Sig=0,120 es mucho mayor que el nivel de significancia de 0,05 se afirma que no existe diferencia significativa entre las disminuciones del tiempo de protrombina en plasma a las diferentes dosis del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Este resultado lo atribuimos a las concentraciones a las cuales se trabajó con el extracto, además que esta prueba se realizó en un tiempo determinado de estudio por lo que no se realizó ningún tratamiento o prueba después de verificar el tiempo de protrombina de las muestras de plasma a baño maría.

4.3 Prueba de la Actividad Hemostática In Vivo.

TABLA N° 20: Resultados de la Evaluación de la actividad hemostática con la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones con heridas.

N° DE GRUPO	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO A APLICAR.	N° DE SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN	TIEMPO DE DISMINUCIÓN (MINUTOS)
GRUPO N°1	CONTROL	Ratón 1	2min/20seg
		Ratón 2	2min/26seg
		Ratón 3	2min/28seg
		Ratón 4	2min/30seg
		Ratón 5	2min/30seg
		Ratón 6	2min/35seg
		Ratón 7	2min/40seg
		Ratón 8	2min/45seg
		Ratón 9	2min/48seg
		Ratón 10	2min/50seg
GRUPO N°2	C1 = 0.01mg/mL	Ratón 1	1min/30seg
		Ratón 2	1min/32seg
		Ratón 3	1min/35seg
		Ratón 4	1min/35seg
		Ratón 5	1min/38seg
		Ratón 6	1min/40seg
		Ratón 7	1min/40seg
		Ratón 8	1min/42seg
		Ratón 9	1min/45seg
		Ratón 10	1min/48seg
GRUPO N°3	C2 = 0.1mg/mL	Ratón 1	1min/20seg
		Ratón 2	1min/20seg
		Ratón 3	1min/22seg
		Ratón 4	1min/25seg
		Ratón 5	1min/28seg
		Ratón 6	1min/30seg
		Ratón 7	1min/32seg
		Ratón 8	1min/35seg
		Ratón 9	1min/35seg
		Ratón 10	1min/38seg
GRUPO N°4	C3 = 1mg/mL	Ratón 1	1min/10seg
		Ratón 2	1min/12seg
		Ratón 3	1min/12seg
		Ratón 4	1min/15seg
		Ratón 5	1min/20seg
		Ratón 6	1min/22seg
		Ratón 7	1min/25seg
		Ratón 8	1min/28seg
		Ratón 9	1min/30seg
		Ratón 10	1min/32seg
GRUPO N°5	PATRÓN	Ratón 1	1min/30seg
		Ratón 2	1min/32seg
		Ratón 3	1min/35seg
		Ratón 4	1min/35seg
		Ratón 5	1min/38seg
		Ratón 6	1min/40seg
		Ratón 7	1min/40seg
		Ratón 8	1min/42seg
		Ratón 9	1min/43seg
		Ratón 10	1min/45seg

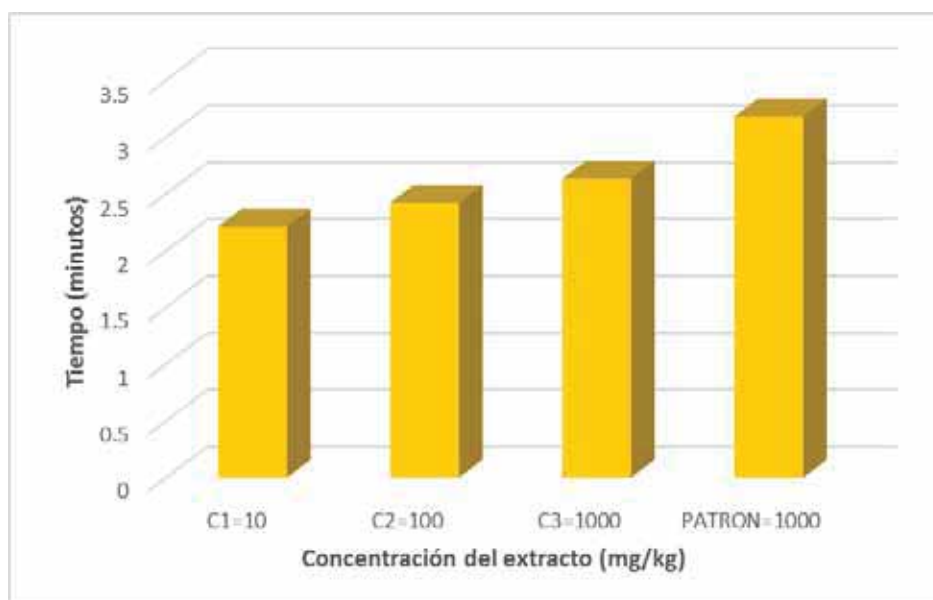
Fuente: Datos experimentales.

Tabla N° 21: Disminución del tiempo de hemostasia con la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones con heridas.

Grupos	Concentración del extracto (mg/kg)	Disminución de tiempo de hemostasia (minutos)	Promedio (min)
C1	10	2.21	2.42
C2	100	2.42	
C3	1000	2.63	
PATRON	1000	3.18	

Fuente: Datos experimentales.

Gráfico N° 5: Disminución del tiempo de hemostasia con la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones con heridas.



Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

- C1: Concentración 1
- C2: Concentración 2
- C3: Concentración 3

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

En el gráfico N° 5 se observa una disminución del tiempo de hemostasia en heridas producidas a ratones al trabajar las diferentes concentraciones del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha", así se puede apreciar que a la dosis 1 (C1=10mg/kg) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de hemostasia de 2.21 min.; en el caso de la dosis 2 (C2=100mg/kg) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de coagulación de 2.42 min.; por último, en la dosis 3 (C3=1000mg/kg) se obtuvo un promedio en la disminución del tiempo de coagulación de 2.63 min.

Por lo que se puede determinar que a la concentración 3, (C3=1000mg/kg), se observa y constituye una dosis adecuada con la que se obtuvo un mejor promedio en cuanto a la disminución del tiempo de hemostasia, esto también en relación con el patrón utilizado (ácido tranexámico) que presenta un promedio del tiempo de disminución del tiempo de hemostasia de 3.18 min.

Esta prueba se realizó mediante el Método de Ivy modificado, el cual estudia la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular y su capacidad para formar el trombo plaquetario que detiene la hemorragia.

Bajo la referencia de los valores normales del tiempo de protrombina que nos brinda el Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología del Instituto Nacional de Salud; nos muestra un tiempo de 2 – 8 min.; en relación con los resultados obtenidos, podemos decir que nuestros valores a las diferentes dosis están dentro de los parámetros de valores normales.

En la Universidad Autónoma de Aguas Calientes, México; se desarrolló un estudio titulado "Daño hepático y en la coagulación de la sangre producido por la administración de los frutos maduros de la planta Tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) en la rata", bajo este estudio se determinó un promedio del tiempo de hemostasia en ratas, siendo su valor de 2.99 min.; este valor, en referencia con nuestro promedio obtenido que nos da un valor de 2.42min., nos

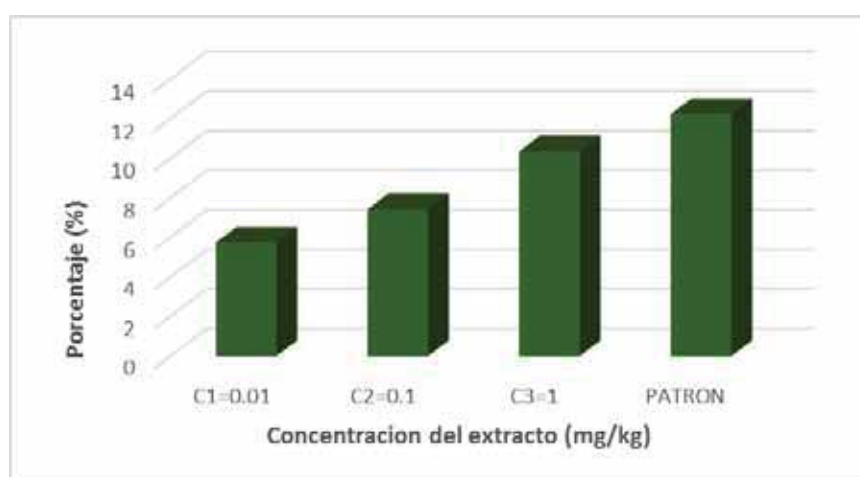
indica que, nuestras dosis a las concentraciones utilizadas refieren un buen tiempo de hemostasia en el rango del tiempo en comparación.

Tabla N° 22: Porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia con la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones con heridas.

Grupos	Concentración del extracto (mg/kg)	Porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia (%)	Porcentaje (%)
C1	10	5.74	7.83
C2	100	7.42	
C3	1000	10.34	
PATRON	1000	12.23	

Fuente: Datos experimentales.

Gráfico N° 6: Porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia con la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones con heridas.



Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

- C1: Concentración 1
- C2: Concentración 2
- C3: Concentración 3

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

Para el gráfico N° 6 se observa un porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia con las dosis utilizadas, aquí podemos observar un porcentaje de forma creciente partiendo de la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) con un porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia de 5.74%, lo mismo con la dosis 2 (C2=0.1mg/mL) con un porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia de 7.42%, hasta llegar a la dosis 3 (C3=1mg/mL) que presenta un porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia de 10.34%, pudiendo apreciar que a esta concentración el porcentaje de disminución del tiempo de coagulación es mayor, en comparación con las otras concentraciones y con el porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia obtenido de nuestro patrón (ácido tranexámico) de un 12.23%, aproximándose ambos porcentajes, lo que nos indica que la dosis 3 es la más efectiva.

Un estudio realizado con el extracto seco hidroalcohólico al 80% de *Lepidium chichiraca* (Desvaux) "chichira"; evidenció un promedio respecto a los valores porcentuales del tiempo de hemostasia, en promedio de 17.91% y en relación con el promedio del porcentaje obtenido con el extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* "misk'icha" al 70% se obtuvo un valor de 7.83%; determinado por el promedio de los valores porcentuales de las diferentes concentraciones ;(0.01, 0.1, 1 mg/mL; Tabla N°18); bajo esta premisa, en ambos estudios que determinan el tiempo de hemostasia, podemos decir que las especies en estudio presentan un valor porcentual distinto uno del otro, evidenciándose una diferencia a más del 50% en cuanto a la disminución del tiempo de coagulación, esto no quiere decir que el efecto sea mínimo o negativo, lo que indica esta diferencia son los tiempos a los cuales actúa cada especie ya que la hemostasia está relacionada con la vasoconstricción capilar, la cual reduce la pérdida de sangre y disminuye el flujo sanguíneo en el sitio de la lesión; la aglomeración (adhesión y agregación) de plaquetas en la pared del vaso lesionado (hemostasia primaria); y la activación de los factores de coagulación, que provoca la formación de una red de fibrina sobre el trombo plaquetario.

- **Análisis estadístico de la actividad hemostática con la aplicación del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% sobre heridas producidas en ratones.**

Tabla N°23: Análisis de varianza de la disminución del tiempo de hemostasia con la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones con heridas.

ANOVA					
TIEMPO DE HEMOSTASIA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	34753,720	4	8688,430	162,705	,000
Dentro de grupos	2403,000	45	53,400		
Total	37156,720	49			

Fuente: Datos experimentales.

Leyenda:

gl: grados de libertad

f: distribución de Fisher (razón)

Sig: significancia comparada (p)

Si $p > 0.05$ = No existe diferencia significativa.

Si $p < 0.05$ = Si existe diferencia significativa.

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

Como el valor de Sig=0,000 es menor que el nivel de significancia de 0,05 se afirma que si existe una diferencia significativa entre los diferentes tiempos de hemostasia a las diferentes dosis del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* “misk’icha”.

Es decir, existen diferencias significativas entre la actividad hemostática de la planta en estudio a las diferentes dosis, también se observa el que el valor de F es mayor a 1 esto nos indica que existe un efecto en el incremento de la actividad hemostática conforme la dosis va en aumento.

Tabla N°24: Prueba de Duncan sobre la Disminución del tiempo de hemostasia con la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones con heridas.

TIEMPO DE HEMOSTASIA					
Duncan ^a					
CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
C1	10	80,60			
C2	10		88,50		
C3	10			98,50	
PATRON	10			98,00	
CONTROL	10				155,20
Sig.		1,000	1,000	,879	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10.000.					

Fuente: Datos experimentales.

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

De la tabla N° 21, podemos apreciar que la dosis 3 (C3=1mg/mL) es la más efectiva, ya que presenta valores cercanos al patrón, esto seguido de la dosis 2 (C2=0.1mg/mL) junto con la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) cuyos valores se ven cercanos; lo que no ocurre con nuestro control que demuestra respecto a sus valores que está muy diferenciado de las otras concentraciones y de nuestro patrón, esto debido a que en este caso no se utilizó ninguna dosis del extracto.

Según el análisis estadístico realizado por las pruebas de ANOVA y Prueba de Duncan, se observa que al utilizar la dosis 3 (C3=1mg/mL), del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70%, en comparación con el patrón, se obtiene una disminución del tiempo de hemostasia muy significativa lo que nos demuestra que el extracto de la especie en estudio aplicada en heridas producidas en ratones, es efectiva en la disminución del sangrado.

Siendo así que no ocurre lo mismo con las otras dosis, que, por lo observado en la Prueba de Duncan, se aprecia que no presentan una diferencia significativa en cuanto al extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70%, en comparación con el patrón.

Bajo estos resultados, podemos decir que la disminución del tiempo de hemostasia es gracias a la presencia de flavonoides, esto gracias a que a nivel vascular presentan una interesante actividad, esto por la acción vitamínica P (efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y el aumento de la resistencia de los capilares). (73)

También se puede atribuir la disminución del tiempo de hemostasia a la presencia de aminoácidos libres presentes en el extracto, estos aminoácidos se encuentran en forma secuencial en la estructura génica del Factor V, que forma el complejo protrombinasas que activa a la trombina, (74) ya que nuestro patrón, el ácido tranexámico (antifibrinolítico), bloquea el efecto de enlace entre la fibrina y la plasminógeno, disolución de coágulos (fibrinólisis), en dosis reducidas, actúa como inhibidor competitivo. (75)

4.4 Pruebas de Toxicidad.

4.4.1 Evaluación de la Toxicidad Oral del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones de experimentación.

Tabla N°25: Observación de la Fase I de la prueba de toxicidad aguda por vía oral en ratones del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70%.

GRUPO	DOSIS (mg/kg)	N° de Ratones	N° de ratones muertos desde los 5 min hasta el día 14	OBSERVACIONES	
				Signos	Aspectos de Comportamiento
1	Control	3	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:0 Agresividad:0 Intranquilidad:0 Depresión:0
2	10	3	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:0 Agresividad:0 Intranquilidad:0 Depresión:0
3	100	3	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:0 Agresividad:0 Intranquilidad:1 Depresión:0
4	1000	3	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:0 Agresividad:0 Intranquilidad:1 Depresión:0

Fuente: Datos experimentales.

Leyenda de las Observaciones:

- 0: Nada
- 1: Ligera
- 2: Moderada
- 3: Severa
- 4: Muy severa

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

En la tabla N° 25 se muestran los resultados obtenidos de la Fase I de la prueba de Toxicidad Aguda por vía Oral del Extracto seco Hidroalcohólico de *Castilleja pumila* "misk'icha" al 70% en ratones, la cual fue aplicada en orden creciente según el método de Lorke, esta tabla nos muestra que los grupos no presentaron reacciones acorde a los signos o aspectos de comportamiento evaluados en esta primera fase; lo que si podemos observar es que respecto a la dosis de (100 y 1000 mg/kg) se ha observado una reacción en cuanto al comportamiento de los animales observándose una ligera intranquilidad. Lo cual puede deberse a una respuesta innata del animal por haber estado sometido a manipulación.

Se interpreta que, bajo los resultados obtenidos, ninguno de los grupos de trabajo presentó muerte de alguno de los animales después de los 14 días de administrada las dosis del extracto. Por lo tanto, podemos decir que el Extracto seco Hidroalcohólico de *Castilleja pumila* "misk'icha" al 70% no es tóxica, esto porque a las dosis sometidas a los ratones en esta Fase I no se produjo la muerte de ninguno de los animales. Por consiguiente, se procedió a trabajar la Fase II del ensayo de Toxicidad Aguda por Vía Oral.

Tabla N° 26: Observación de la Fase II de la prueba de toxicidad aguda por vía oral en ratones del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70%.

GRUPO	DOSIS (mg/kg)	N° de Ratones	N° de ratones muertos desde los 5 min hasta el día 14	OBSERVACIONES	
				Signos	Aspectos de Comportamiento
1	Control	1	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:0 Agresividad:0 Intranquilidad:0 Depresión:0
2	1600	1	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:0 Agresividad:0 Intranquilidad:1 Depresión:0
3	2900	1	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:1 Agresividad:0 Intranquilidad:2 Depresión:0
4	5000	1	0	Piloerección:0 Somnolencia:0 Diarrea:0 Dolor abdominal:0 Temblores:0	Irritabilidad:2 Agresividad:0 Intranquilidad:2 Depresión:0

Fuente: Datos experimentales.

Legenda de las Observaciones:

- 0: Nada
- 1: Ligera
- 2: Moderada
- 3: Severa
- 4: Muy severa

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

En la tabla N° 26 se muestran los resultados obtenidos de la Fase II de la prueba de Toxicidad Aguda por vía Oral del Extracto seco Hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones, al administrar las dosis en forma creciente del extracto, los resultados nos muestran que en los grupos de trabajo no se presentaron signos de piloerección, somnolencia, diarrea, temblores (contorsiones abdominales); por otro lado en cuanto a los aspectos de comportamiento se observó que a la dosis de 1600 mg/kg el ratón presentó ligeramente una etapa de intranquilidad esto podría deberse a una reacción propia del animal después de haber sido sometido a manipulación, también se observa que a la dosis de 2900 mg/kg el ratón presentó una moderada respuesta de intranquilidad y una ligera respuesta de irritabilidad que fue disipándose al cabo de unos 30 min. Otra respuesta que se observó fue en la administración de la dosis de 5000 mg/kg en el que el ratón presentó una moderada reacción en cuanto a la irritabilidad e intranquilidad que duró aproximadamente por 1 hora, después fue desapareciendo paulatinamente hasta llegar a un comportamiento normal, esta reacción pudo deberse a factores externos, puesto que los animales estaban cerca a un lugar con bastante ruido de automóviles.

Por los resultados obtenidos se puede afirmar que el Extracto seco Hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% no produjo una toxicidad significativa a las dosis utilizadas en la Fase II, y tampoco se produjo la muerte de ninguno de los animales de experimentación en los diferentes grupos de trabajo del ensayo de toxicidad. Por lo cual se concluye que la DL50 > 5000 mg/kg del Extracto seco Hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70%.

4.4.2 Evaluación de la Toxicidad Dérmica del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones de experimentación.

Tabla N° 27: Observación del ensayo de irritación dérmica aguda en ratones con el extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70%.

SOLUCIÓN A APLICAR	GRUPOS	FORMACIÓN DE EDEMA								FORMACIÓN DE ERITEMA							
		ABRASIÓN				NO ABRASIÓN				ABRASIÓN				NO ABRASIÓN			
		1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h	1h	24h	48h	72h
CONTROL	SUBGRUPO 1A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SUBGRUPO 1B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1= 1gr/ml	SUBGRUPO 2A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SUBGRUPO 2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2= 3gr/ml	SUBGRUPO 3A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SUBGRUPO 3B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C3= 5gr/ml	SUBGRUPO 4A	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
	SUBGRUPO 4B	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1

Fuente: Datos experimentales.

Análisis, interpretación y discusión de resultados:

En la tabla N° 27 se muestra el ensayo de irritación primaria que se realizó con el extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” al 70% en ratones, al administrar las dosis empapadas en gasa y luego de realizar las observaciones en los periodos de tiempo de 1h, 24h, 48h y 72h, no se observó la formación de eritema y/o edema, en una escala apenas perceptible, considerando así, que el extracto al 70% no es una sustancia irritante.

La toxicidad por absorción dérmica de la sustancia en prueba, se desarrolló con la finalidad de determinar los efectos de la dosis de la planta en estudio; es muy

importante la observación para señalar la aparición de síntomas o manifestaciones que indiquen daño a la salud de los animales en estudio. (69)

Un estudio realizado con el extracto seco hidroalcohólico al 80% de *Lepidium chichiraca* (Desvaux) "Chichira" (2005) indica que la planta en estudio no produjo ningún tipo de reacción dérmica, comprobando así que esta planta produce toxicidad tópica en un grado mínimo, en valoración de 1 y 2 para la dosis de 0.6mg/mL, que fue la mayor concentración utilizada para este ensayo.

Basándonos en el estudio realizado de *Castilleja pumila* "misk'icha", podemos señalar que la planta estudiada presenta toxicidad dérmica de valor considerable, puesto que su valoración es de 1.

CONCLUSIONES

1. Se evaluó la actividad coagulante, in vitro en muestras de sangre venosa y la actividad hemostática y toxicidad aguda por vía oral y tópica in vivo en ratones albinos *Mus musculus*; del extracto seco hidroalcohólico al 70% *Castilleja pumila* "misk'icha".
2. Las pruebas de solubilidad demostraron que el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha"; es soluble en solventes polares principalmente en agua, alcohol al 40% y 70% e insoluble en solventes apolares como el hexano y el cloroformo.
En el análisis fitoquímico del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha" se obtuvo la mayor presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides y quinonas, en regular cantidad se obtuvo metabolitos secundarios como, compuestos fenólicos, aminoácidos, saponinas, azúcares reductores, por otro lado, no se evidenció la presencia de taninos y alcaloides.
3. La evaluación respecto a la disminución del tiempo de coagulación in vitro en muestras de sangre venosa; con la adición de extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha"; obtuvimos un porcentaje desde la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) hasta llegar a la dosis 3 (C3=1mg/mL); presentando un porcentaje de 15.67%, pudiendo concluir así, que el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha" a la concentración 3 (C3=1mg/mL) es más efectiva.
Respecto a la evaluación de la disminución del tiempo de protrombina in vitro en muestras de sangre venosa humana, utilizando plasma, con la adición del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha" pudimos observar un porcentaje desde la dosis 1 (C1=0.01mg/mL) hasta llegar a la dosis 3 (C3=1mg/mL); presentando un porcentaje de 8.45%, siendo esta concentración la más efectiva.
4. Se determinó la actividad hemostática en heridas producidas en animales de experimentación, del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha", se observó que el mejor tiempo se da la

concentración 3 (C3=1mg/mL) que presenta un porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia de 10.34%, concluyendo que esta es la dosis más efectiva.

5. Se evaluó la toxicidad por vía oral en ratones albinos *Mus musculus* del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha", usando el modelo de Lorke de dos fases. En la primera fase no se presentó ningún animal muerto a lo largo de los 14 días de prueba. Se prosiguió con la segunda fase, la cual dio como resultado ninguna muerte de los animales en las 24 horas; se llegó a la conclusión que el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha" no es tóxico por vía oral.
6. Se evaluó la toxicidad aguda tópica en ratones albinos *Mus musculus* del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha", por el método de Irritación Primaria en piel según Draize, se concluye que al periodo de evaluación en tiempo de 1h, 24h, 48h, 72h; no se ha presentado una reacción resaltante en la formación de eritema y/o edema, considerando así, que el extracto al 70% no es una sustancia irritante.
7. Se comparó la actividad hemostática del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Castilleja pumila* "misk'icha" in vivo, frente al ácido tranexámico, el trabajo demostró que a la dosis 3 (C3=1mg/mL) esta presentó un porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia de 10.34%, apreciándose que a esta concentración el porcentaje de disminución del tiempo de coagulación es mayor, este resultado es cercano al porcentaje de disminución del tiempo de hemostasia obtenido de nuestro patrón (ácido tranexámico) de un 12.23%, lo que nos indica que la concentración 3 es la más efectiva.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

A LOS DOCENTES Y AUTORIDADES.

- ✓ Fomentar el estudio en plantas medicinales con la implementación de laboratorios con equipos y reactivos que faciliten un mejor trabajo que esté a la par en la investigación con otros países.

A LOS ESTUDIANTES.

- ✓ Continuar la investigación de los efectos coagulante y hemostático de *Castilleja pumila* “misk’icha” a dosis más altas de las utilizadas en este estudio.
- ✓ Que se desarrollen estudios fitoquímicos cuantitativos de los principios activos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha” responsables de la actividad coagulante y hemostática.
- ✓ Realizar estudios como criterio de pureza e identificación de sustancias de *Castilleja pumila* “misk’icha”, mediante la Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier o HPLC.
- ✓ Organizar campañas de salud dirigidas a la población dando a conocer las propiedades de esta planta, así como el diagnóstico y prevención de trastornos hemorrágicos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Femenia J. Hugo, Flora del Famatina, Argentina - 2009.
2. Cabieses, F. Aspectos etnológicos de la coca y la cocaína” -Seminario Interamericano sobre Aspectos Médicos y Sociológicos de la Coca y la Cocaína Lima Editorial F. R. Jeri. – 1980.
3. Rado B., Etnobotánica del Distrito de Ocongate – Quispicanchi – Cusco. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Facultad de Ciencias Biológicas. Cusco - 2011.
4. Organización Mundial de la Salud – OMS. Estrategia de la OMS sobre la Medicina Tradicional 2014 – 2023. Impreso en Hong Kong SAR, China. 2013.
5. Cotillo P., Rojas L., Métodos Farmacológicos en la Investigación de Productos Vegetales, 1er Ed. Editorial Jarmac – UNMSM, Lima – Perú, 1990.
6. Pareja B., Plantas Medicinales – Dermofarmacia, Folia Dermatológica Peruana Vol. 12, Lima – Perú, 2001.
7. Alexandru N, Jardín I, Popov D, Simionescu M, García-Estañ J, Salido GM, Rosado JA. Effect of homocysteine on calcium mobilization and platelet function in type 2 diabetes mellitus. Articles from Journal of Cellular and Molecular Medicine. PubMed. 30 Octubre 2008.
8. Sandoval D. Alteraciones hemostáticas en diabetes mellitus idiopática. Rev Invest Clín. 1981;33(4):355-9.
9. Alfonso O, De la Barca M, Ramos C, Ruiz M, Alvarado Y. La coagulación en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Revista del Hospital Clínico Quirúrgico "Arnaldo Milián Castro", Vol. 8, Núm. 2, 2014.
10. Information Colombia.com. [Online].; 2014. Available from: <https://www.colombia.com/vida-sana/salud/sdi/86366/segun-estudio-420000-personas-en-el-mundo-sufren-de-hemofilia>.
11. Information America Noticias. [Online].; 2018. Available from: <https://www.americatv.com.pe/noticias/salud/hemofilia-sintomas-como-diagnosticarla-y-tratamiento-n318444>.

12. Dirección Regional de Salud Cusco. Boletín Epidemiológico Regional. 45th ed. Cusco; 2017.
13. Madan R1, Gupt B, Saluja S, Kansra UC, Tripathi BK, Guliani BP. Coagulation profile in diabetes and its association with diabetic microvascular complications. Articles from Journal of Association of Physicians of India. PubMed. Agosto 2010.
14. Molina Y. Estudio Etnobotánico y Etnofarmacológico de plantas medicinales de Tambopata, Madre de Dios, Perú. Rev. Ciencia y Desarrollo. Vol. 14. 2011.
15. Cerón C. Manual de Botánica: Sistemática, Etnobotánica y Métodos de Estudio en el Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Quito Editorial universitaria 2003.
16. Zavala D., Carrillo M., Alvarado B., Sánchez A. Evaluación de la Toxicidad Aguda de un Extracto Alcohólico de hojas de hojaseñ (*Flourensia cernua*). Unidad Académica Multidisciplinaria, Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 41. Núm. 3. Julio - Septiembre 2010.
17. Ministerio de Salud - Dirección General de Epidemiología. Análisis de Situación de Salud del Perú. La Victoria – Lima. Setiembre 2013.
18. Fundación SUYANA. Programa de Fortalecimiento Integral de Comunidades Rurales en Extrema Pobreza. Manejo y Mejoramiento de Pasturas Naturales Altoandinas. 2da. Edición. La Paz, Bolivia Julio 2011.
19. Fernández F. La Flora local como Estrategia para Reducir Riesgos Climáticos desde un Enfoque Etnoecológico; caso comunidad Challoma (prov. Tapacari) del Departamento de Cochabamba. Universidad Mayor de San Simón - Facultad de Ciencias y Tecnología. Cochabamba – Bolivia. Octubre, 2014.
20. Programa de Asuntos Internacionales y Biodiversidad de la Sociedad Peruana de Derecho Ambiental. Taller: Acuerdos para Incentivar la Conservación de la Agrobiodiversidad. Actividad propuesta en el Plan de

Acción Estratégica 2015-2021 para la adaptación al cambio climático de comunidades campesinas ubicadas en zonas agrobiodiversas de Huánuco, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Apurímac, Cusco y Puno. Junín 6 de mayo de 2015.

21. Concha F. Efecto in vitro del látex de *Ficus insípida* sobre la cascada de la coagulación sanguínea. Revista Médica Herediana. Vol.21. Num.3 Lima – Julio 2010.
22. Brazón J. Aislamiento y caracterización de compuestos fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Octubre – 2015.
23. Diaz A., Pérez L., Castro A., Chein S., Sánchez J., Tenorio J., Vílchez E., Efecto Coagulante de dos Variedades de Hoja de Coca en muestras de sangre de Ratas Albinas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vol. 10. Núm. 1. Lima; 2007.
24. Pastor S., Evaluación del Efecto Coagulante de la tela de la araña *Scytodes longipes* Aplicada en muestras de Sangre Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 2015.
25. García A, Ordoñez M, Briones M. Biodiversidad de Oaxaca. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México, 2004.
26. Information Naturalista. [Online].; Available from: <https://www.naturalista.mx/taxa/733567-Castilleja-pumila>.
27. León B., Roque J., Ulloa C., Pitman N., Jorgensen P., Cano A., El Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Revista Peruana de Biología. Vol. 13. Núm. 2. Lima, 2006.
28. Dalmau A., Fisiología de la Hemostasia. Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge.
29. Fuentes X., Castiñeiras M., Queraltó J. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. 2da Ed. Editorial Reverté, Barcelona -1998.
30. Torres L., Tratado de Cuidados Críticos y Emergencias. Ediciones Arán. Puerta del Mar, Cádiz; 2002.

31. Flores O., Ramírez K., Meza J., Nava J. Fisiología de la coagulación. Revista Mexicana de Anestesiología. Vol. 37. Supl. 2 Octubre-Diciembre 2014.
32. Sharathkumar A., Shapiro A. Trastornos de la Función Plaquetaria. Federación Mundial de Hemofilia. Tratamiento de la Hemofilia. Núm. 19. 2da Ed. Abril 2008.
33. Teller P., White T. Fisiología de la Cicatrización de la Herida: De la lesión a la Maduración. Revista Elsevier. España 2010.
34. Vera M. Dermatología – Cicatrización. Universidad de Aquino Bolivia. Cochabamba – Bolivia. 2017. [Online].; Available from: <https://es.slideshare.net/jhoawhramirezr/cicatrizacion-by-hans>
35. Carrasco M, García B, Rubio F, Técnicas Hematológicas y Citológicos. Ediciones Paraninfo. Pag. 296. Madrid – España 2004.
36. Delgado L, Lopez M, Romero E. La Coagulación. [Online]. Available from: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2011/10/la-coagulacion.pdf>
37. Gonzales G, Esquivel D. Tratamiento Odontológico en niños con Trastornos de la Hemostasia. Revisión de la literatura y recomendaciones para la clínica. Univ. Odontol. 2011 Ene-Jun; 30(64): 19-29.
38. Rodríguez I. Hemostasia. [Online]. Available from: [file:///C:/Users/ACER/Downloads/t_13tel%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/ACER/Downloads/t_13tel%20(1).pdf)
39. Rodon J., Evaluación de la Hemostasia. Santa Marta – Mataro. 1992.
40. Best – Taylor. Bases Fisiológicas de la Practica Médica. Editorial Médica Panamericana. 14va Edición. Argentina.
41. Arias J., Aller M., Arias J., Aldamendi I. Enfermería – Medico Quirúrgica I. Editorial Tébar. Pág. 311. Madrid.
42. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Medica. Decimotercera Edición. España Interamericana Editores; España 2000.
43. Martínez C., Mecanismos de Activación de la Coagulación. Rev. Med. Instituto Mexicano del Seguro Social; 44 (Supl 2): 51-58. México 2006.

- [Online]. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2006/ims062l.pdf>
44. Pérez A., Medicina Transfusional. Editorial Medica Panamericana. Pág. 85. Madrid 2009.
 45. Gálvez K, Cortés A. Coagulación y Sangrado Masivo: Nuevos Conceptos Fisiopatológicos. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal ed. Medellín, Colombia; 2011.
 46. López A. Plaquetas, Hemostasia y Coagulación. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Editorial Lara. Venezuela; 2016. [Online]. Available from: <https://studylib.es/doc/5162059/plaquetas--hemostasia-y-coagulaci%C3%B3n>
 47. Quintero E, Sabater M, López J. Hemostasia y tratamiento odontológico. Revista Scielo. Avances en Odontoestomatología. Vol.20. Núm. 5. Madrid, España. 2004.
 48. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R. Las células endoteliales humanas en cultivo generan factor tisular en respuesta a la endotoxina. Rev. The Journal of Clinical Investigation. Junio – 1983.
 49. Fischbach D, Koval P, Fogdall R. Coagulación: fundamentos Buenos Aires: Revista Panamericana; 1985.
 50. Tripathi K. Farmacología en Odontología: Fundamentos. Primera Edición. Editorial Medica Panamericana; Nueva Delhi, India: 2005.
 51. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) Argentina; 2015. [Online]. Available from: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/normativas_medicamentos_cuerpo.asp
 52. Palacios M. Farmacognosia y Fitoquímica. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote. Chimbote 2013. [Online]. Available from: https://issuu.com/leono/docs/farmacognosia_y_fitogu_mica_tf
 53. Loomis A. TED. "Fundamentos de Toxicología", 3º edición, Editorial Acribia, Zaragoza- España. 1982.

54. Litter, M. "Compendio de Farmacología". Cuarta Ed. Editorial EL ATENEO. Buenos Aires, Argentina. 1988.
55. Lorke D. "Un nuevo acercamiento a la comprobación de toxicidad aguda práctica" toxicot. 1983.
56. Draize J. Lank R. Calvery H. Toxicity studies of sbstances applied topically to the skin, Fed. Proc. 4. 1945.
57. Aguilar S. Fórmulas para el Cálculo de la Muestra en Investigaciones de Salud. Rev. Salud en Tabasco. Vol. 11. Núm. 1-2. Villahermosa, México, 2005.
58. Roche Diagnostics SL002. CoaguCheck. [Online].; 30 de Enero de 1998 [cited 2019 agosto 07. Available from: http://www.coagucheck.es/coagucheck_hcp/en/home/coagulation_monitoring/medical_and_scientific_information/prothrombin_time_INR.html.
59. Merck Sharp & Dohme Corp. M. Manual MSD. [Online].; 1899 [cited 2019 agosto 07. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-pe/professional/trastornos-cardiovasculares/s%C3%ADntomas-de-las-enfermedades-cardiovasculares/edema>.
60. Weininger S, Stermitz F. Química Orgánica. primera ed. España: Reverte; 1988.
61. Geissman T. Principios de Química Orgánica. segunda edición. Editorial Reverte; Los Angeles - 1973.
62. Espinoza S. Chambi B. Efecto Gastroprotector y Toxicidad Aguda de *Senecio rhizomatosus rusby* "Ticilla Huarmi" Cusco; 2002.
63. Mosby. Diccionario de Medicina. Cuarta Edición ed.: Oceano; 2002.
64. Palomino A. Actividad Antibacteriana In Vitro de *Pelargonium hortorum* Baley (geranio) sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y evaluación de la toxicidad aguda Cusco; 2003.
65. Cascante M. Guía para la Recolecta y Preparación de Muestras Botánicas. Museo Nacional de Costa Rica, San José, Costa Rica - Herbario Nacional. 2008.

66. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las Drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Primera Ed. ed. Barcelona: Ediciones Omega.; 2000.
67. Lock O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Ed. ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
68. Muñoz M, Morón, C. Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología. Instituto Nacional de Salud. 2005.
69. Martínez V. Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensioactivo de tipo lipoaminoácido. (tesis) ed. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2007.
70. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional del Perú: Actividad Antimicrobiana In Vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Medicinales P, editor.: Redylac; 2001.
71. Ramírez O. Quinonas e Hidroquinonas. Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2012.
72. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología.
73. Transito M. Flavonoides. Elsevier. 2002 Abril; Vol. 21. Núm. 4. Pág. 108-113.
74. Gómez R, Guerra T, Dita L, Fernández J, Cabrera M. Teoría Celular de la Coagulación: de las cascadas a las membranas celulares.; Vol. 9. Núm. 2. MediSur – Marzo 211.
75. Tengborn L. Inhibidores Fibrinolíticos en el Control de Trastornos de la Coagulación. Federación Mundial de Hemofilia. Núm. 42. Noviembre – 2012.
76. J. C. Colombia.com. [Online].; 2014. Available from: <https://www.colombia.com/vida-sana/salud/sdi/86366/segun-estudio-420000-personas-en-el-mundo-sufren-de-hemofilia>.

ANEXOS

ANEXO N° 1: CERTIFICACIÓN DE LA ESPECIE BIOLÓGICA EN ESTUDIO



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA
CERTIFICACION**

El que suscribe, Profesor Investigador Asociado del Herbario Vargas (CUZ) y Experto científico CITES certifica que la Alumna Shirley Cruzkayna Mendoza Álvarez, Código 110658- B, de la Facultad Ciencias de la Salud: Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ha, sometido a consulta muestras botánicas colectadas para su determinación, las que al ser diagnosticadas a tratamiento taxonómico corresponden a las especies:

En la clasificación APG III (Angiosperm Phylogenetic Group) la ubicación taxonómica corresponde a:

***Castilleja pumila* (Benth.) Wedd.**
Familia: Orobanchaceae, Nombre Común; Miskicha

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Lamiales Bromhead
- Familia: Orobanchaceae Vent.
- Género: *Castilleja* Mutis ex L. f. Especie:
- ***Castilleja pumila* (Benth.) Wedd.**
-

Lo que se certifica para los fines concernientes al caso.



Washington Galiano Sánchez M. Sc., Dr. (c).
Prof. Principal Dpto. Académico de Biología
Experto Científico CITES

ANEXO N° 2: CERTIFICACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

		INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS BIOTERIO	
CERTIFICADO SANITARIO N°		<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">311-2016</div>	
Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M-50-2016
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 150
Cepa	: Balb/c/CNPB	Sexo	: hembras
Peso	: 15 a 24 g.		
Edad	: 25 a 32 días		
Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M-50-2016
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 80
Cepa	: Balb/c/CNPB	Sexo	: machos
Peso	: Mayor a 25 g.		
Edad	: 1 mes ½		
Guía de Remisión	: 033687	Destino	: FUNSAAC Cusco
Fecha	: 15 de Diciembre del 2016		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe el presente, Arturo Rosales Fernández, Coordinador de Bioterio. Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias*.</p>			
<p>* Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, cuarentena y control sanitario para animales de experimentación.</p>			
<p>Chorrillos, 15 de Diciembre del 2016</p>			
<p>NOTA : El bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>		<p><i>Arturo Rosales Fernández</i> M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586 <small>M.V. ARTURO ROSALES FERNÁNDEZ</small> <small>Coordinador de Bioterio</small> <small>DEPVI - CUSCO, PERÚ</small></p>	
<div style="border: 2px solid blue; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO</p> <p>EL FEDATARIO que suscribe, autenticar que el presente documento es COPIA FIEL DEL ORIGINAL de la que doy fe.</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold;">19 DIC 2016</p> <p>Sr. Victor Morales Pareja <small>REGISTRO RES. N° R-004-2015-FUNSAAC</small> <small>PARA USO EXCLUSIVO EN LA FUNSAAC</small></p> </div>			

ANEXO N° 3: PRUEBAS DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

✓ **Determinación de azúcares reductores:**

Prueba de Benedict: A 0.5mL de extracto agregar 0.2mL de reactivo de Benedict, se somete a ebullición por 5 minutos y se deja enfriar. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica prueba positiva.

Prueba de Felling: A una mezcla de 0.2 mL de Fehling A con 0.2mL de Fehling B agregar 0.05mL de extracto y calentar en baño de agua a ebullición. La presencia de precipitado de color rojo ladrillo indica prueba positiva.

✓ **Determinación de Glicósidos:**

A 200mg de extracto agregar 2 mL de ácido clorhídrico al 1% refluja por 5 minutos, enfriar, neutralizar con hidróxido de sodio al 1%, realizar prueba de Benedict y/o la Prueba de Fehling. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica prueba positiva.

✓ **Determinación de aminoácidos:** Prueba de Ninhidrina

A 0.5 mL de extracto acidificado con ácido clorhídrico al 1 %, agregar 2 a 3 gotas de la solución de ninhidrina al 1 %, calentar por 5 minutos en baño de agua a ebullición. Coloraciones rojizas, violetas o amarillas indican prueba positiva.

✓ **Determinación de flavonoides:** Reacción de Shinoda

A 0.5mL de extracto agregar algunas limaduras de magnesio más 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Coloraciones rojizas amarillentas indican prueba positiva.

✓ **Determinación de compuestos fenólicos:**

A 0.5 ml de extracto agregar 1 a 2 gotas de cloruro férrico al 1%. La presencia de precipitado o coloraciones azuladas-verdosas indica prueba positiva.

✓ **Determinación de Alcaloides:**

Para realizar esta prueba A 0.5g del extracto agregar HCl al 5%, solubilizar, filtrar, alcalinizar con NaOH al 5% y extraer con cloroformo, de la fase de cloroformo separada

extraer nuevamente con solución acida diluida, este procedimiento tiene gran ventaja de eliminar los compuestos que puedan dar falso positivo.

A 5 mL de la solución agregar 2 a 3 gotas de reactivo de Dragendorff, la formación de un precipitado naranja o marrón indica prueba positiva.

✓ **Determinación de Taninos.** Prueba de gelatina-sal.

Obtener una solución acuosa a partir del extracto, en 3 tubos de ensayo y colocar 3ml de esta solución, al primero agregar 5 gotas de solución de NaCl 5%, al segundo agregar 5 gotas de solución gelatina al 1%, al tercero agregar 5 gotas de solución gelatina al 1% disuelto en solución de NaCl al 5%, la formación del precipitado con solución gelatina indica prueba positiva.

✓ **Determinación de Saponinas.** Prueba de la espuma.

A un tubo de ensayo que contenga 2mL de extracto, diluir 5 veces su volumen en agua y se agita vigorosamente por 30 segundos. La formación de espuma persistente por 30 minutos indica prueba positiva.

✓ **Determinación de triterpenos y/o esteroides:**

Reacción de Lieberman-Burchard: A 0.5mL de extracto agregar 2 a 3 gotas del reactivo de Lieberman-Burchard. Una coloración azul o azul verdoso (esteroides) o coloración rosado o rojo purpura (triterpenos) indican prueba positiva.

✓ **Determinación de Quinonas:** Reacción de Bornträger.

La muestra triturada se trata con una solución al 5% de Hidróxido de Potasio en caliente, se filtra, enfría y acidula; a continuación, se sacude con benceno y deja en reposo. Se separa la fase bencénica a la cual se añade una solución de Hidróxido amónico. La formación de un color rojo indicara prueba positiva.

✓ **Determinación de Lactonas:** Prueba de Baljet.

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse

el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol 1mL. En estas condiciones se adicionó 1mL de reactivo y se observó cambio de coloración.

ANEXO N° 4: GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATÓN – INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

CAPÍTULO II

El ratón: Su microambiente y macroambiente

Microambiente

Caja o Jaula:

Los ratones se alojan en cajas o jaulas que pueden ser de metal o de plástico (polipropileno, policarbonato, poliestireno y polysulfano), provistas de tapas de acero inoxidable con o sin filtro. La altura de las paredes de la caja no debe ser menor de 12,7 cm. Debe tener las siguientes características:

- Proporcionar espacio adecuado, ser cerrado, seguro y protegerlo de las amenazas externas.
- Ser adecuado en ventilación.
- Ser resistente al lavado, desinfección y esterilización frecuente.
- Permitir la observación del animal.
- Tener pisos y paredes fáciles de limpiar (superficies lisas) y con tapa removible de rejillas o perforada.
- Mantenerse en buenas condiciones de uso.
- Facilitar el acceso de los animales al agua y alimento.
- No presentar bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones.

Recomendaciones de espacio (Densidad animal):

El número de animales por jaula estará en relación con el tamaño corporal evitándose la sobrecarga. El tamaño de las jaulas o cajas debe ser apropiado; por ejemplo, en el caso de ratones adultos, se requiere una superficie mínima de 80 cm² por animal. El requerimiento mínimo es que el animal disponga de espacio suficiente para moverse y para expresar las posturas normales de conducta y sociabilidad, debe tener fácil acceso al agua y alimento y debe tener un área suficiente con material de lecho limpio y sin obstáculos para moverse y descansar.

Lecho o cama

Los lechos serán de material absorbente tal como la viruta de madera, la coronta molida del maíz, etc.; libres de polvillo, alérgenos y sustancias tóxicas. Deben ser esterilizables. Se debe tener especificaciones de calidad de la viruta para su adquisición, tales como:

- No ser nocivo.
- Capacidad de absorción.
- No se recomienda el uso de viruta procedente de cedro o caoba.

Agua de bebida

El agua debe ser potable y suministrarse libremente durante toda la vida.

Alimento: dietas y requerimientos

Se debe contar con un procedimiento para la adquisición de alimento y los requisitos que este debe reunir, tales como:

- Composición, que deberá cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactancia y mantenimiento del ratón.
- Debe ser agradable al paladar (palatable) y digestible.
- Tener fecha de elaboración y caducidad.
- Certificado de análisis químico proximal y microbiológico por cada lote.
- Estar libre de harina de pescado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes patógenos.
- El alimento en forma de pellet debe tener la consistencia requerida, para evitar pérdida del alimento y el animal pueda consumirlo.

Composición química de una dieta estándar

Componentes	Porcentaje (%)
Proteína cruda	20
Grasa cruda	9.81
Fibra cruda	2,15
Cenizas	6,38
Consumo diario de alimento	3-6 g
Consumo diario de agua	3-7 mL

Fuente: EL ratón, OPS

Macroambiente

Aire y ventilación

Los ambientes destinados a la producción de animales, en su interior, deben poseer ventilación con presión positiva de aire respecto a los pasillos o áreas exteriores, manteniendo las gradientes de presión, de tal forma que se evita el ingreso de patógenos desde el exterior. La ventilación es importante para controlar la humedad, calor, gases tóxicos. Se debe generar entre 15 a 20 recambios de aire / hora.

Temperatura y humedad relativa

Las exigencias de temperatura para ratones son de 20 a 25 °C y la humedad relativa ambiental entre 40 y 70%.

Intensidad de luz y tipo de iluminación

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomienda 12 horas luz/12 horas oscuridad.

Ruido

Los ratones son muy sensibles al ruido y pueden percibir frecuencias de sonido que son inaudibles para el ser humano, por lo que el personal debe tratar de minimizar la generación de ruido innecesario.

Olor

No se deben utilizar desinfectantes que emanen olores, que sean irritantes y mucho menos desodorizantes, dentro de los ambientes del bioterio. La percepción de amoníaco en el ambiente es un indicador de saturación del lecho, por lo que se recomienda tener programas de cambio de lecho según la población que se maneje.

ANEXO N° 5: ENCUESTA PARA REALIZAR EL ESTUDIO DE “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE, HEMOSTÁTICA Y TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL Y TÓPICA DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Castilleja pumila* (misk’icha).”

I. DATOS GENERALES.

1. NOMBRE Y APELLIDOS:

.....

2. EDAD:

II. PATOLOGÍAS.

1. ¿PADECE USTED DE ALGUNA DE ESTAS ENFERMEDADES?

- a) Enfermedades Cardiacas.
- b) Varices
- c) Hepatopatías (cirrosis, hepatitis)
- d) Otras (diabetes, hipertensión, colesterol)

III. MEDICACIÓN.

1. ¿Toma algún medicamento actualmente? SI NO

- a) Antibióticos (ceftriaxona, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, eritromicina)
- b) AINES (aspirina, paracetamol, naproxeno, tenoxicán)
- c) Anticoagulantes (heparina, enoxaparina, warfarina)

IV. ¿Tiene usted problemas de hemorragia nasales u otro tipo de hemorragia? SI
NO

V. ¿Al hacerse una herida tarda mucho en parar de sangrar? SI NO

VI. ¿Alguna vez se sometió a un examen para evaluar el tiempo de coagulación? SI
NO

ANEXO N° 6: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Castilleja pumila* “misk’icha”.

SOLVENTE	SOLUBILIDAD A T°A
Agua	
Etanol 40%	
Etanol 70%	
Etanol 90%	
Acetona	
Cloroformo	
Hexano	

Interpretación de Resultados:

Signos	Significado
++++	Totalmente soluble
+++	Soluble
++	Poco soluble
--	Insoluble

**ANEXO N° 7: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL ANÁLISIS
FITOQUÍMICO**

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO		
METABOLITO SECUNDARIO	REACTIVO	CANTIDAD DE METABOLITO SECUNDARIO PRESENTE EN EXTRACTO
ALCALOIDES	Dragendorff	
FLAVONOIDES	Shinoda	
TANINOS	Gelatina - sal	
COMPUESTOS FENOLICOS	Cloruro férrico	
AZUCARES REDUCTORES	Benedict // Fehling	
GLICÓSIDOS	Benedict // Fehling	
AMINOÁCIDOS	Ninhidrina	
SAPONINAS	Prueba de la Espuma	
ESTEROIDES	Lieberman-Burchard	
QUINONAS	Bornträger	
LACTONAS	Boljet	

Interpretación de Resultados:

Signos	Significado
+++	Abundante cantidad del metabolito
++	Regular cantidad del metabolito
+	Poca cantidad del metabolito
--	Ausencia del metabolito

ANEXO N° 8: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN POR EL MÉTODO DE WHITE MODIFICADO IN VITRO A DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Castilleja pumila* “misk’icha” EN MUESTRAS DE SANGRE.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS A PROBAR		N° DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACIÓN									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
		TIEMPO DE COAGULACIÓN (MINUTOS)									
NUMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR PERSONA	CONTROL										
	C1										
	C2										
	C3										

**ANEXO N° 9: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DEL TIEMPO DE
 PROTROMBINA POR EL MÉTODO DE QUICK MODIFICADO IN VITRO A
 DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE
Castilleja pumila “misk’icha” EN MUESTRAS DE PLASMA.**

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS A PROBAR		N° DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACIÓN									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
		TIEMPO DE PROTROMBINA (SEGUNDOS)									
NUMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR PERSONA	CONTROL										
	C1										
	C2										
	C3										

**ANEXO N°10: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DEL TIEMPO DE HEMOSTASIA
A DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE
Castilleja pumila “misk’icha” SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES.**

N° DE GRUPO	CONCENTRACION DE EXTRACTO A APLICAR.	N° DE SUJETOS DE EXPERIMENTACION	TIEMPO DE DISMINUCIÓN (MINUTOS)
GRUPO N°1	CONTROL	Ratón 1	
		Ratón 2	
		Ratón 3	
		Ratón 4	
		Ratón 5	
		Ratón 6	
		Ratón 7	
		Ratón 8	
		Ratón 9	
		Ratón 10	
GRUPO N°2	C1 = 0.01mg/mL	Ratón 1	
		Ratón 2	
		Ratón 3	
		Ratón 4	
		Ratón 5	
		Ratón 6	
		Ratón 7	
		Ratón 8	
		Ratón 9	
		Ratón 10	
GRUPO N°3	C2 = 0.1mg/mL	Ratón 1	
		Ratón 2	
		Ratón 3	
		Ratón 4	
		Ratón 5	
		Ratón 6	
		Ratón 7	
		Ratón 8	
		Ratón 9	
		Ratón 10	
GRUPO N°4	C3 = 1mg/mL	Ratón 1	
		Ratón 2	
		Ratón 3	
		Ratón 4	
		Ratón 5	
		Ratón 6	
		Ratón 7	
		Ratón 8	
		Ratón 9	
		Ratón 10	
GRUPO N°5	PATRON	Ratón 1	
		Ratón 2	
		Ratón 3	
		Ratón 4	
		Ratón 5	
		Ratón 6	
		Ratón 7	
		Ratón 8	
		Ratón 9	
		Ratón 10	

**ANEXO N°11: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LAS OBSERVACIONES
REALIZADAS EN LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA TÓPICA- IRRITACIÓN
PRIMARIA DE PIEL, CON LA ADMINISTRACIÓN A DIFERENTES DOSIS DEL
EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Castilleja pumila* “misk’icha”
SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES.**

N° DE GRUPO	CONCENTRACION A UTILIZAR	N° DE SUBGRUPO	N° DE RATONES	EDEMA		ERITEMA	
				ABRASIÓN	NO ABRASIÓN	ABRASIÓN	NO ABRASIÓN
GRUPO N° 1	CONTROL	Subgrupo 1a	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 3				
		Subgrupo 1b	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 2				
GRUPO N° 2	C1	Subgrupo 2a	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 3				
		Subgrupo 2b	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 3				
GRUPO N° 3	C2	Subgrupo 3a	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 3				
		Subgrupo 3b	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 3				
GRUPO N° 4	C3	Subgrupo 4a	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 3				
		Subgrupo 4b	RATON 1				
			RATON 2				
			RATON 3				

**ANEXO N°12: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LAS OBSERVACIONES
REALIZADAS EN LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA – POR VÍA ORAL, CON LA
ADMINISTRACIÓN A DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO SECO
HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Castilleja pumila* “*misk’icha*” EN RATONES.**

N° DE GRUPO	DOSIS A UTILIZAR	N° DE RATONES	OBSERVACIONES
FASE I	CONTROL	RATON 1	
		RATON 2	
		RATON 3	
	C1	RATON 1	
		RATON 2	
		RATON 2	
	C2	RATON 1	
		RATON 2	
		RATON 3	
	C3	RATON 1	
		RATON 2	
		RATON 3	
FASE II	CONTROL	RATON 1	
	C1	RATON 2	
	C2	RATON 3	
	C3	RATON 4	

ANEXO N°13: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACION EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

La Bachiller Shirley Cruzkayna Mendoza Alvarez, asesorada por el Dr. Nerio Góngora Amaut, lleva a cabo la investigación intitulada **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE, HEMOSTÁTICA Y TOXICIDAD AGUDA POR VIA ORAL Y TÓPICA DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Castilleja pumila* (misk'icha)**. Este estudio le servirá como tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Se realiza con el propósito de evaluar y demostrar si la planta ***Castilleja pumila*** posee un efecto pro coagulante y hemostático en muestras de sangre humana. El procedimiento consiste en extraer 8mL de sangre de la vena del paciente.

La participación del paciente es totalmente voluntaria, si usted decide no participar en el presente estudio o retirarse del mismo en cualquier momento, su decisión no le afectara ahora ni el futuro. Además, por la participación, por ser voluntaria no recibirá ningún pago. Si existiera alguna duda o problema que se presente antes, durante o después del desarrollo de la investigación podrá contactarse con la responsable de la investigación: Shirley Cruzkayna Mendoza Alvarez cel 944510857.

Por este medio, Yo

.....estoy enterado(a) de todo el procedimiento que se realizará y por medio de mi firma confirmo que se me ha explicado satisfactoriamente el contenido de este consentimiento y de los procedimientos que se contemplan. Con mi firma y nombre al final de este documento, autorizo a la persona encargada del presente estudio.

Nombre:..... DNI:.....

Firma:

Teléfono:.....

Lugar y fecha:.....

ANEXO N°14: ARCHIVO FOTOGRAFICO

Imagen N° 1: *Castilleja pumila* “misk’icha”, foto tomada en la comunidad de Lauramarca.



Imagen N° 2: Evaporación del extracto de *Castilleja pumila* “misk’icha”, para realizar los estudios de análisis fitoquímico y solubilidad.



**Imagen N° 3: Corte realizado a los animales de experimentación –
Prueba de Hemostasia.**



**Imagen N° 4: Administración del extracto seca hidroalcohólico de
Castilleja pumila “misk’icha al 70% a los animales de experimentación -
Prueba de Hemostasia.**



Imagen N° 5: Aplicación del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha al 70% a los animales de experimentación, para la prueba de toxicidad dérmica.



Imagen N° 6: Administración del extracto seco hidroalcohólico de *Castilleja pumila* “misk’icha al 70% a los animales de experimentación, para la prueba de toxicidad oral.



Imagen N° 7: Extracción de muestras de sangre venosa - Prueba de Tiempo de Coagulación y Protrombina.



Imagen N° 8: Control del tiempo en baño maría - Prueba de Tiempo de Coagulación y Protrombina.

