

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).

Evaluation of the coagulant, hemostatic activity and acute toxicity by oral and topical route of the hydroalcoholic dry extract 70% of Castilleja pumila (misk'icha).

Recibido: 12 de marzo 2019 | Aceptado: 4 de mayo del 2019

Mendoza Shirley¹

¹ *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.*
Correo electrónico : qfshirley25@gmail.com

Resumen

El presente trabajo tiene el objetivo de demostrar la actividad coagulante, hemostática y toxicidad aguda vía oral y tópica del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila (misk'icha), en muestras de sangre venosa y en heridas producidas en ratones; el método utilizado fue un análisis fitoquímico cualitativo y un estudio de solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70%. 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. Se obtuvo 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 hemostática se obtuvo 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. Según la metodología planteada se tuvo en observación a los animales, y durante este tiempo no hubo presencia significativa, es decir, cambios morfológicos representativos, determinando así que bajo esta prueba se produce una toxicidad tópica en un grado mínimo, de cero a cuatro. Tampoco hubo presencia significativa en cuanto a los signos y síntomas 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 present work has the objective of demonstrating the coagulant, hemostatic activity and acute toxicity via oral and topical of the 70% hydroalcoholic dry extract of *Castilleja pumila* (misk'icha), in venous blood samples and in wounds produced in mice; The method used was a qualitative phytochemical analysis and a solubility study of the hydroalcoholic extract at 70%. A quasi-experimental study was conducted with only post-test and control group; furthermore, the experimental animals were not randomly assigned; rather, these groups were already formed before the experiment. A reduction percentage of the clotting time of 15.67% was obtained for dose 3 (C3 = 1mg / mL), so it can be concluded that this dose is the most effective; and a percentage decrease in prothrombin time of 44%, for dose 3 (C3 = 1mg / mL), so it can be concluded that this dose is the most effective. For hemostatics, a percentage of the hemostasis decrease time of 10.34% was obtained, with dose 3 (C3 = 1000mg / kg) from which we conclude that this is the most effective dose. According to the proposed methodology, the animals were observed, and during this time there was no significant presence, that is, representative morphological changes, thus determining that under this test a topical toxicity occurs in a minimum degree, from zero to four. There was also no significant presence in terms of signs and symptoms in the 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 bleeding, it 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 Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 por ciento de la población mundial consume hierbas medicinales para tratar algún tipo de afección. (Femenia, 2009).

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. (Cabieses, 1980). Según el estudio Etnobotánico realizado por Rado (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 Ocongate - 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. (Rado, 2011).

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 evaluó 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.

Metodología

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.

Para la determinación del tiempo de coagulación y el tiempo de protombina se utilizó el método de White y el método de Quick, respectivamente; para ello, se utilizaron muestras de sangre humana de 10 voluntarios, las muestras fueron divididas en tres para 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). 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) del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila (misk’icha). Para la determinación de toxicidad aguda por irritación dérmica se hizo mediante el criterio de Draize; 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).

Análisis de resultados***Determinación de Porcentaje de Humedad de la planta Castilleja pumila “misk’icha”.*****Tabla 1***Porcentaje de humedad de la planta Castilleja pumilla (misk’icha)*

Muestra	Placa N°	Peso de la muestra fresca (gr)	Peso de la muestra seca (gr)	Porcentaje de Humedad (%)	Promedio (%)
Planta de Castilleja pumila “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	

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. (Alzamora, 2001).

Determinación de Porcentaje de Rendimiento del extracto seco hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila “misk’icha”.**Tabla 2***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 Castilleja pumila “misk’icha” (tallos, hojas, flores) molida	10.12 gr	2.371gr	23.42%

El resultado de Rendimiento, (Kuklinski C. 2000) 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.

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

Tabla 3

Solubilidad del extracto seco hidroalcohólico al 70% DE Castilleja pumila “misk’icha”.

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

Nota: +++ (Muy Soluble), ++ (Soluble), + (Medianamente Soluble), --(Insoluble)

Para esta prueba de Solubilidad (Lock, 1994), 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.

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

Tabla 4

Análisis Fitoquímico Cualitativo del Extracto seco Hidroalcohólico al 70% de Castilleja pumila “misk’icha”.

Análisis fitoquímico 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	+
Esteroides	Acetato de cobre	+
Quinonas	Lieberman burchard Borntrager	+++

Nota: +++ (Abundante cantidad del metabolito), ++ (Regular cantidad del metabolito), + (Poca cantidad del metabolito), -- (Ausencia del metabolito).

Se muestran los resultados realizados del análisis fitoquímico cualitativo (Lock, 1994), 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. 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. (Ramírez, 2012). 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.

Prueba de la Actividad Coagulante In Vitro.

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

Tabla 5

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"

Tabla 6

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	
C1	0.01	6.36	6.27
C2	0.1	6.25	
C3	1	6.21	

De acuerdo al Método utilizado, para el Tiempo de Coagulación por el Método de White-Modificado (Muñoz, 2005). 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. (INS, 2000.).

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

Tabla 7

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
	<u>TIEMPO DE PROTROMBINA (SEGUNDOS)</u>									
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

Tabla 8

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
	<u>TIEMPO DE PROTROMBINA EN INR</u>									
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

Tabla 9

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 (%)
<u>CONTROL</u>	0.2	14.20	
C1	0.01	13.41	12.93
C2	0.1	13.06	
C3	1	12.33	

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 (INS, 2000.); 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.

De acuerdo al Método utilizado para el Tiempo de Protrombina en plasma por el Método de Quick-Modificado (Muñoz, 2005). 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.

Prueba de la Actividad Hemostática In Vivo.

Tabla 10

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.

Nº de grupo	Concentración de extracto a aplicar.	Nº de sujetos de experimentación	Tiempo de disminución (minutos)
GRUPO Nº1	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 Nº2	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 Nº3	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 Nº4	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 Nº5	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

Tabla 11

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	
C2	100	2.42	2.42
C3	1000	2.63	
PATRON	1000	3.18	

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, (ANMAT; 2015). 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, (Muñoz, 2005), 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; (INS, 2000.); 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.

Pruebas de Toxicidad.***Evaluación de la Toxicidad Oral del extracto seco hidroalcohólico de Castilleja pumila “misk’icha” al 70% en ratones de experimentación.*****Tabla 12**

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

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

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

Se observan 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, (Lorke, 1983), 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 13

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 Rato- nes	N° de ratones muertos desde los 5 min hasta el día 14	OBSERVACIONES	
				Signos	Aspectos de Comporta- miento
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

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

Se observan 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 presento 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 presento una moderada respuesta de intranquilidad y una ligera respuesta de irritabilidad que fue disipándose al cabo de unos 30 min. Otra respuesta que se obverso fue en la administración de la dosis de 5000 mg/kg en el que el ratón presento una moderada reacción en cuanto a la irritabilidad e intranquilidad que duro 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 de 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, (Lorke D. 1983) 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%.

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

Tabla 14

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	SUB GRUPO 1A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SUB GRUPO 1B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1= 1gr/ml	SUB GRUPO 2A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SUB GRUPO 2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2= 3gr/ml	SUB GRUPO 3A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SUB GRUPO 3B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C3= 5gr/ml	SUB GRUPO 4A	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
	SUB GRUPO 4B	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1

Se observa que al 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. (Martínez, 2007)

Discusión

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”. 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. 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. 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.

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). (Transito, 2002). 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, (Gómez, 2011) 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. (Tengborn, 2012). 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. Se evaluó la toxicidad aguda tóxica 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. 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.

Referencias

- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2001). Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales De La Facultad De Medicina*, 62(2), 156-161. <https://doi.org/10.15381/anales.v62i2.4167>
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) Argentina; 2015. [Online]. http://www.anmat.gov.ar/webanmat/normativas_medicamentos_cuerpo.asp
- Cabieses, F. (1980). 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.
- Femenia, H. (2009), *Flora del Famatina*.
- Gómez Baute, R., Guerra Alfonso, T., Dita Salabert, L., Fernández Águila, J., & Cabrera Zamora, M. (2011). Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *Medisur*, 9(2), 146-155. Recuperado de <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/1177>
- Instituto Nacional de Salud (2000). *Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología*.
- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega.
- Lorke D. (1983). Un nuevo acercamiento a la comprobación de toxicidad aguda práctica. *toxicot*.
- Lock O. (1994) *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. Segunda Ed. ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Martínez V. (2007) *Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensioactivo de tipo lipoaminoácido*. Universidad de Barcelona.
- Muñoz M y Morón, C. (2005.) *Manual de Procedimientos de Laboratorio en Técnicas Básicas de Hematología*. Instituto Nacional de Salud.
- Ramírez O. (2012) *Quinonas e Hidroquinonas*. Universidad de Chile.
- Rado, B. (2011) *Etnobotánica del Distrito de Ocongate – Quispicanchi – Cusco*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Transito, M. (2002) *Flavonoides*. Elsevier. Vol. 21. Núm. 4. Pág. 108-113.

Tengborn L. (2012) *Inhibidores Fibrinolíticos en el Control de Trastornos de la Coagulación*. Federación Mundial de Hemofilia. Núm. 42.