

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE OBSTETRICIA



EFFECTO ANTICOAGULANTE *IN VITRO* DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DEL RIZOMA DE *Curcuma*
***longa* L. “PALILLO” EN MUESTRAS SANGUÍNEAS**
DE MUJERES JÓVENES

TESIS PARA OBTENER TÍTULO PROFESIONAL DE OBSTETRA

AUTORAS

Bach. VILLALTA VALDERRAMA, KARO MERCEDES

Bach. GARCÍA CORREA, JENNY

ASESORA

Dra. JUANA DEL CARMEN GUERRERO HURTADO

TRUJILLO - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE OBSTETRICIA



**EFFECTO ANTICOAGULANTE *IN VITRO* DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DEL RIZOMA DE *Curcuma
longa* L. “PALILLO” EN MUESTRAS SANGUÍNEAS
DE MUJERES JÓVENES**

TESIS PARA OBTENER TÍTULO PROFESIONAL DE OBSTETRA

AUTORAS

Bach. VILLALTA VALDERRAMA, KARO MERCEDES

Bach. GARCÍA CORREA, JENNY

ASESORA

Dra. JUANA DEL CARMEN GUERRERO HURTADO

TRUJILLO - PERÚ

2017

DEDICATORIA

DEDICATORIA

A Dios por iluminar mi mente por estar en cada paso que doy y por haber puesto en mi camino a personas que fueron mi ayuda en mi etapa de estudios.

A mi madre Soledad, pilar fundamental de lo que soy, quien con su esfuerzo y dedicación, a lo largo de mi vida se preocupó por mi bienestar y educación.

En memoria a mi padre Telmo, guía y amor quien inculco en mi valores y principios para afrontar la vida.

A mis hijos Lautaro y Benjamín, mis amados seres de mi vida, estímulo de mi superación y fortaleza para seguir luchando por mis metas trazadas.

A mi asesora Dra Juana Del Carmen Guerrero Hurtado por su apoyo y sugerencias en nuestro trabajo de investigación.

VILLALTA VALDERRAMA, KARO MERCEDES.

DEDICATORIA

**A Dios por permitirme culminar mi carrera
y cada etapa del presente proyecto.
En memoria a mi padre Marco Tulio quien se
esforzó
arduamente para darme una buena educación.
A mi madre Ana Isabel por ser mi guía y apoyo
incondicional en mi vida.
A mi tía Felicita por su consideración y su apoyo
en mis estudios y culminación de mi carrera
profesional.
A mis hijos Camilo y Rodrigo que son mi inspiración
y
fuerza para cumplir todas mis metas.
A nuestra asesora Dra Juana del Carmen Guerrero
Hurtado por su apoyo y orientación en
el presente trabajo de investigacion.**

GARCÍA CORREA, JENNY

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a nuestra asesora de tesis Dra Carmen Guerrero Hurtado por su apoyo en la elaboración y ejecución del presente trabajo de investigación

A todas aquellas personas que directa e indirectamente nos apoyaron (técnicos, microbiólogos, asistentes) en nuestro estudio en los laboratorios de química de la UPAO.

A las mujeres jóvenes participantes que desinteresadamente decidieron apoyarnos en la ejecución del trabajo de investigación.

Las autoras.

ÍNDICE

	PAGINA
PORTADA	I
PÁGINAS PRELIMINARES	
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	14
III.RESULTADOS	27
IV.DISCUSIÓN	32
V. CONCLUSIONES	40
VI.RECOMENDACIONES	41
VII. REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ENSAYO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL RIZOMA DE <i>Curcuma longa</i> L.	Pag. 28
TABLA 2. TIEMPOS DE COAGULACIÓN EN MINUTOS OBTENIDOS POR MÉTODO DE BURKER	Pag. 29
TABLA 3. PROMEDIO DE TIEMPOS DE COAGULACIÓN EN MINUTOS OBTENIDOS POR MÉTODO DE BURKER	Pag. 30
TABLA 4. COMPARACIÓN DE TIEMPOS DE COAGULACIÓN EN MINUTOS OBTENIDOS POR MÉTODO DE BURKER EN LOS 4 ESTIMULOS.	Pag. 31

RESUMEN

La *Curcuma longa* L “palillo” es muy utilizado en medicina tradicional como antiinflamatorio, antibacteriano, antioxidante, anticancerígeno, entre otros y su efecto sobre la coagulación sanguínea continúa siendo motivo de investigación. El objetivo fue determinar el efecto anticoagulante *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L, en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes sanas. Se realizó un estudio experimental analítico transversal utilizando el método de Burker para cuantificar el tiempo de coagulación de 64 muestras sanguíneas procedentes de 16 mujeres jóvenes sanas, de quienes se obtuvo 4 muestras sanguíneas de cada una, conformando así un grupo blanco (sin estímulo) y 3 grupos con estímulo de Citrato de Sodio 3.8%, extracto de *Curcuma longa* L. al 50% y otro con extracto al 100%. El análisis fitoquímico preliminar del extracto se realizó mediante el ensayo a la gota. Los datos obtenidos se analizaron con medidas de tendencia central y con la prueba T de Student para grupos independientes. Resultados: El extracto utilizado estaba compuesto principalmente por taninos hidrolizables, flavonoides, esteroides, quinonas y cardiotónicos, las participantes del estudio tuvieron 22.93 años con tiempos de coagulación normales (5.23 minutos), el estímulo con extracto etanólico al 100% obtuvo un tiempo de coagulación de 89.18 ± 14.81 minutos, siendo significativamente mayor que los otros estímulos ($p=0.000$). En conclusión, el extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo” posee efecto anticoagulante *in vitro* sobre muestras sanguíneas de mujeres jóvenes sanas.

Palabras clave: *Curcuma longa* L., anticoagulante, *in vitro*, mujeres jóvenes.

ABSTRACT

Curcuma longa L. "palillo" is widely used in traditional medicine as anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, anticancer, among others and its effect on blood coagulation continues to be a reason for investigation. A cross-sectional analytical study was carried out using the Burker method to quantify the coagulation time of 64 blood samples from 16 healthy young women from whom 4 blood samples were obtained from each one, dividing them into one control and 3 samples with stimulus, Sodium Citrate 3.8%, 50% Turmeric long L. extract and 100% extract. Preliminary phytochemical analysis of the extract was performed by the drop test. Data were analyzed with measures of central tendency and with Student's T test for independent groups. Results: The extract used was composed mainly of tannins, flavonoids, esteroids, quinones and cardiotonics; the study participants had 22.93 years with normal coagulation times (5.23 minutes), the with 100% ethanolic extract stimulus obtained a coagulation time of 89.18 ± 14.81 minutes, being significantly higher than the other stimuli ($p=0.000$). In conclusion, the ethanolic extract of the rhizome of *Curcuma longa* L. "palillo" has anticoagulant effect *in vitro* on blood samples of healthy young women.

Keywords: *Cúrcuma longa* L., anticoagulant, *in vitro*, young women

I. INTRODUCCION

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas. De estas muertes, 7,4 millones se debieron a la cardiopatía coronaria, y 6,7 millones, a los accidentes cerebro vasculares (ACV), y por tromboembolia venosa (TEV)¹

Las dos manifestaciones más frecuentes de la TEV son la trombosis venosa profunda (TVP) y la tromboembolia pulmonar (TEP). La TVP, es potencialmente mortal cuando se acompaña de embolia pulmonar, pues el trombo venoso se localiza a nivel de la circulación pulmonar acabando con la vida de la persona en tan solo unos instantes².

En el caso de las mujeres, las situaciones con mayor riesgo de sufrir trombosis se presentan en quienes utilizan anticonceptivos orales (ACO) o tratamientos hormonales sustitutivos, o en quienes tienen problemas hereditarios, o se embarazan y sumado a estos están los factores adquiridos, entre ellos el tabaco, que produce un efecto pro coagulante. El factor común de todos estos casos es la edad, pues quienes utilizan ACO y se embarazan son en su mayoría mujeres jóvenes^{3,4}.

En nuestro país, según la encuesta demográfica de salud (ENDES) del 2014 el 47% de las mujeres entre 15 y 49 años son menores de 30 años⁵, y el uso de ACO se ha incrementado casi en el 75% desde la década pasada, además 3 de cada 4 mujeres usan algún método anticonceptivo⁵. Por lo tanto, combinando la chance del embarazo y el uso de la anticoncepción oral con otros factores de riesgo como

trombofilia, tabaco y uso de estrógenos, las mujeres en edad fértil, en su mayoría jóvenes, tienen aumentado el riesgo de desarrollar una enfermedad tromboembólica venosa⁴.

En este sentido, el uso de anticonceptivos orales y de terapia de reemplazo hormonal, son dos factores que pueden predisponer a una trombosis venosa profunda en mujeres. Los estrógenos orales son ampliamente utilizados por muchas mujeres y no todas desarrollan trombosis³. A veces se da la condición de que algunas de estas, tienen algún tipo de trombofilia, que al mezclar con los anticonceptivos orales de tipo combinado, favorece el desarrollo de esta enfermedad⁴.

En el embarazo desde el inicio, la madre experimenta una serie de cambios fisiológicos y anatómicos, provocados y a la vez regulados, por cambios hormonales que abarcan casi sin excepción a todos los órganos y sistemas⁵. Uno de estos cambios es a nivel cardiovascular, en donde podemos encontrar desde variaciones en la frecuencia cardíaca, hasta aumentos en el volumen y cambios en la composición sanguínea, por su implicancia sobre distintos sistemas del organismo femenino, a continuación se resumen los cambios que sufre la mujer embarazada a nivel cardiovascular⁶.

A nivel sanguíneo se alteran los factores de la coagulación por acción de estrógenos y progesterona, aumentando el fibrinógeno junto con un incremento en la inhibición de la fibrinólisis, lo que cataloga al embarazo como un estado de hipercoagulabilidad, de gran utilidad postparto (hemostasia eficaz post

desprendimiento placentario), pero de alto riesgo para la madre, aumentando las posibilidades de sufrir trombosis venosa profunda^{7, 8}.

El recuento plaquetario disminuye en el embarazo normal, posiblemente debido al aumento de la destrucción y la hemodilución (debido al aumento del plasma en relación a las células sanguíneas), con una disminución máxima en el tercer trimestre. Posteriormente debido al aumento gradual de los factores de la coagulación y al fibrinógeno (pudiendo llegar éste último al 200% por encima de los niveles previos al embarazo) puede producirse un estado hipercoagulabilidad⁸.

La hemostasia proviene de dos raíces griegas: haima “sangre” y stasis “detener”. Es un mecanismo de defensa del organismo para limitar la pérdida de sangre después de la lesión de un vaso sanguíneo. El sistema hemostático es producido en dos etapas llamadas hemostasia primaria y secundaria^{8,9}.

La hemostasia primaria, ocurre en segundos después del daño o lesión vascular, provocando una vasoconstricción refleja seguido de una gran agregación plaquetaria entre sí, con el tejido subendotelial y con el factor de Von Willebrand, formando el tapón hemostático primario⁸. En éste proceso es de gran importancia la liberación y síntesis de sustancias que inducen la agregación de otras plaquetas, entre las cuales están el difosfato de adenosina (ADP), tromboxano A2, calcio y serotonina. El tapón hemostático debido a su fragilidad y desprendimiento de la pared vascular requiere de la fibrina para hacerlo fuerte y estable^{7,9}.

La hemostasia secundaria se realiza por la generación de fibrina por reacciones bioquímicas de algunas proteínas del plasma llamados factores de la coagulación que al vincularse con los vasos sanguíneos lesionados y el tapón de plaquetas forma el tapón hemostático secundario^{10, 11} Las reacciones se producen a manera de cascada por proceso de activación secuencial, los factores de la coagulación inactivos circulantes (zimógenos) se transforman en enzimas activas, resultando como sustrato final de la cascada el fibrinógeno que por acción de la trombina se convierte en fibrina. La hemostasia secundaria tiene tres vías intrínseca, extrínseca y común⁸.

En la vía intrínseca, los componentes están dentro de la corriente circulatoria, se inicia por el contacto de la sangre con una superficie artificial por lesión o injuria, activando al factor XII, el cual convierte a la precalicreína en calicreína y la calicreína convierte al factor XII en XIIa (todas las formas activadas llevan el subíndice a), el factor XIIa actúa sobre el factor XI para liberar XIa, en presencia de calcio el factor XIa convierte al factor IX en IXa. En la superficie plaquetaria se forma un complejo de factores IXa-X-VIII-fosfolípidos y calcio que actúan sobre el factor X convirtiéndolo en Xa^{8, 12}.

La vía extrínseca requiere de factores que no circulan en la sangre llamado factor tisular, proteína sintetizada en el endotelio de vasos sanguíneos como respuesta a una injuria o lesión; se inicia la vía extrínseca con la activación del factor VII por el factor III o tromboplastina por su posición fosfolipídica, provocando la activación del factor VII en VIIa en presencia de calcio, se forma un complejo VIIa-

III-ca que actúa sobre el factor X convirtiéndolo en Xa. Ambas vías se unen en este punto dando inicio a la vía común^{9, 13}.

En la vía común el factor Xa convierte a la protrombina o factor II a trombina o factor IIa, la trombina convierte al fibrinógeno en fibrina el cual estabiliza al coagulo sanguíneo en tapón permanente e insoluble¹².

Finalmente, los procesos de hemostasia y fibrinólisis en condiciones normales guardan un equilibrio perfecto entre ellos, lo que permite mantener la integridad del sistema vascular. Cuando estos mecanismos se pierden pueden aparecer diversos enfermedades que van desde la hemorragia hasta la trombosis. Entender estos mecanismos permitirá ofrecer la mejor estrategia de tratamiento dirigida a restablecer el equilibrio entre sangrado y procoagulación, Al respecto de esta problemática, se han planteado numerosos trabajos acerca de una profilaxis con anticoagulantes ¹⁴.

Los anticoagulantes son medicamentos que actúan para prevenir la formación de coágulos en la sangre, el engrosamiento de un coagulo existente, no los disuelven pero interfieren en la cascada de la coagulación, incluyen en este grupo a las heparinas y los anticoagulantes orales como la acenocumarina, ácido acetil salicílico (aspirina), clopidogrel, entre otros¹¹. Sin embargo aún no existe algo exacto que garantice la totalidad del éxito de dichos esquemas de terapia por los efectos secundarios que presentan, de tal forma que como alternativa de solución a este problema, se podría encontrar en los recursos naturales como las plantas.

El uso de las plantas medicinales es una práctica ancestral, universal y cotidiana, en todas las épocas de la historia del hombre y que se transmite de generación en

generación en forma empírica. Hoy en día se ha comprobado científicamente las propiedades medicinales de una gran variedad de plantas y en muchas de ellas se han extraído los principios activos constituyendo medicamentos de uso en la práctica clínica¹⁵.

Desde hace décadas, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda y respalda el uso de plantas medicinales dentro de la medicina alternativa; estima que casi el 80% de todos los habitantes de la tierra los usan para resolver sus principales problemas de salud, llegando al 90% en los países en vías de desarrollo¹⁶. De estos últimos, el Perú es uno de los países más destacados en diversidad biológica; existen variedad de especies de plantas medicinales, muchas de las cuales poseen propiedades terapéuticas¹⁷. Entre estas propiedades se encuentran los hipoglicemiantes, hipolipemiantes, antineoplásicos, protectores gástricos, protectores hepáticos, antimicrobianos, anticoagulantes, entre otras-especies para ensayar sus efectos benéficos¹⁸.

Algunos trabajos han ensayado, probado y mostrado el efecto anticoagulante de diversas plantas, entre ellas, *Allium cepa*¹⁹ “cebolla”, *Allium Sativum* “Ajo”, *Zingiber officinale* Roscoe²⁰ “Jengibre” y frutas como *Vitis vinífera* “uva”, *Citrus limetta* Risso (Lima), *Citrus aurantifolia* “Limón”, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “naranja”^{21, 22}; al respecto, Zarzosa E, et al (Perú, 2015)²³, demostraron que los zumos de cebolla, uva, *Carica papaya* “papaya” y *Ananas comosus* “piña” tienen de un efecto anticoagulante *in vitro* e *in vivo*, además recalcan que el ajo y jengibre solo mostraron efecto anticoagulante *in vitro*.

Dentro de esta lista, encontramos a *Curcuma longa* L. conocida en el Perú como “Palillo”, que pertenece a la familia de las Zingiberáceas. Es una planta de casi 1 metro de altura con tallo subterráneo formado por un rizoma central y los brotes amarillo-naranja. Sus hojas son grandes, anchas y con pecíolos largos verde claro. Las flores amarillas se agrupan en espigas basales con brácteas violáceas. El fruto es capsular, globosa, y sus semillas ovoides y ariladas²⁴. Esta planta, es utilizada tradicionalmente por sus efectos antiinflamatorios, antiulcerosos, antiespasmódicos, estimulantes de la lactancia y detoxificante, ha llamado la atención de distintos investigadores, por lo cual se han realizado variables estudios fármaco-toxicológicos del palillo, reconociendo que esta planta contiene flavonoides, polifenoles, glucósidos, taninos, triterpenos y otros compuestos con marcada acción antioxidante, efectos antiinflamatorios e inmunomodulado²⁴.

Estudios realizados encontraron que su rizoma contiene principalmente la curcumina (ácido turmérico), un polifenol, además su aceite esencial es rico en sesquiterpenos (turmerona, atlantona y curcumenol), monoterpenos (borneol, alcanfor, terpineno, entre otros), así como hidrocarburos terpénicos^{25, 26} (felandreno, sabineno, cineol y turmerol). Además, contiene almidón, goma, oxalato de calcio y proteasas²⁷.

Dado sus componentes se le han atribuido múltiples efectos y usos medicinales. Entre estos, se ha utilizado para dar solución a los trastornos gastrointestinales, Thong D, et al²⁸ (Escocia, 2012), demostró que la curcumina actúa a través de factor nuclear (NF) y reduce la producción de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias, resultando en la mejora de la lesión gástrica en gastropatía inducida

por antiinflamatorios no esteroideos en ratas. También mejoró el daño de la mucosa gástrica, disminuyendo la adherencia de leucocitos y la producción del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) después de la administración de curcumina. Otros autores administraron extracto de *Curcuma longa* L. en tabletas, lo cual disminuyó la prevalencia del dolor, molestia abdominal en el síndrome de intestino irritable, entre el inicio y luego del tratamiento de ocho semanas, consiguiendo mejoras significativas en la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad²⁹. Posteriormente se demostró que disminuye la secreción de jugo gástrico e incrementa los contenidos de mucina, por lo que puede proteger contra las úlceras gástricas y gastritis³⁰.

También ha demostrado su efecto hepatoprotector en diversos trabajos experimentales, mediante efectos antioxidantes y antifibróticos^{31,32}. Somanawat K, et al³³ (Tailandia, 2013), concluyen que la curcumina previene la lesión del hígado en la hepatitis inducida en ratones macho, evidenciado a través de la mejora de la histopatología del hígado por la disminución del estrés oxidativo, reducción de la inflamación del hígado y la restauración la bioquímica hepática. Así mismo, se ha visto que reduce el daño oxidativo en el hígado, mostrando un efecto hepatoprotector en ratones, trabajo realizado por Lee H y colaboradores³⁴. Estos hechos están relacionados con los efectos antioxidantes que posee esta especie, propiedad atribuida tanto a la curcumina como a los péptidos y residuos de metionina presentes^{35,36}.

Como antiinflamatorio³⁷, la curcumina ha demostrado que inhibe un número de diferentes moléculas implicadas en la inflamación, incluyendo la fosfolipasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa-2 (COX-2), leucotrienos, tromboxano, prostaglandinas, óxido nítrico, colagenasa, elastasa, hialuronidasa, TNF- α e IL-12. De forma similar, el efecto beneficioso de la curcumina en la sepsis parece estar mediada por incremento del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma³⁸ (PPAR- γ), que conduce a la supresión de citoquinas proinflamatorias y expresión de TNF- α . Como se dijo, estas propiedades se sospecha que son debidas a la cúrcuma, cetonas sesquiterpénicas y a los polisacáridos presentes en el rizoma de esta planta, logrando incluso suprimir la expresión de la interleucina (IL)-1 β y TNF- α ³⁹.

A la curcumina también se le ha encontrado que posee actividades contra el cáncer a través de su efecto sobre una variedad de vías biológicas que participan en la mutagénesis, expresión de oncogenes, regulación del ciclo celular, apoptosis, tumorigénesis y metástasis. Ha demostrado efecto anti-proliferativo en múltiples tipos de cáncer, y es un inhibidor del factor de transcripción NF-B (proneoplásico) y de productos de distintos productos génicos (c-myc, Bcl-2, COX-2, óxido nítrico sintetasa, TNF- α e interleucinas). Además, la curcumina afecta a una variedad de receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular que participan en el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis^{40,41}.

Como antimicrobiano, se han realizado estudios en donde se utilizó la curcumina, demostrando efecto antiviral, y el más resaltante, frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como lo muestra Prasad S y Tyagi⁴² en el

2015, encontrando que la cúrcuma y sus análogos poseen efectos inhibidores de proteasa e integrasa del VIH, así como otros trabajos en donde sus resultados reportan efecto antifúngico, como el de Nagarathnam R⁴³ (India, 2009) que evaluó este efecto frente a *Pythium aphanidermatum*, *Trichoderma viridae* y *Fusarium sp*, hallando que la cúrcuma es efectiva contra estos agentes a 10ug/mL.

Mayanglamban A, et al (Filadelfia, 2010), realizaron un trabajo utilizando sangre de carnero encontraron que el extracto etanólico de palillo revierte la agregación plaquetaria mediante inhibición del colágeno o trombina; otro estudio realizado en la India en el 2011, utilizó aceite de cúrcuma en isquemia miocárdica en roedores, demostrando que la cúrcuma tiene efecto antiagregante plaquetario mediante la inhibición de ADP y trombina^{44,45}.

Kim M, et al (Corea, 2013), reportaron que curcumina y su derivado bisdemetoxicurcumina prolongaron significativamente el tiempo de tromboplastina parcial activada y el tiempo de protrombina, además inhibieron las actividades de trombina y factor X activado, en un estudio realizado *in vitro* con un extracto etanólico al 80%⁴⁶.

Shivalingu B, et al (India, 2015), realizaron un estudio en donde probaron 3 tipos de cúrcumas concluyendo que las especies son ricas en proteasas serina y cisteína con un efecto procoagulante asociado con actividad fibrinogenolítica, logrando así detener el sangrado y ayudar al proceso de curación de heridas practicado por la medicina tradicional india, si bien el método utilizado (colocación directa sobre una herida) varia con respecto a los anteriores, y que estas plantas utilizadas pertenecen a otro país, esto es muestra de cierta forma que los efectos de las cúrcumas (dentro

de ellas el palillo), aún no son comprendidos en su totalidad, siendo necesario continuar las investigaciones de manera especial sobre la coagulación sanguínea, en plantas de nuestra región⁴⁷, con la finalidad de poder contribuir al conocimiento científico, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿El extracto etanólico del rizoma de *Cúrcuma longa* L. “palillo” posee efecto anticoagulante *in vitro* sobre muestras sanguíneas de mujeres jóvenes?

1. JUSTIFICACIÓN

Según la encuesta demográfica de salud (ENDES) 2014 en el Perú la población femenina de 15 a 49 años de edad continúa siendo una población relativamente joven pues el 47% de ellas son menores de 30 años. En el desarrollo femenino se producen diferentes cambios hormonales, los más importantes surgen a favor de la preparación hacia la maduración sexual y la procreación. En la encuesta ENDES se reporta que el uso de métodos anticonceptivos en el Perú se incrementó a 74.6%, entre 1992 al 2014 y 3 de cada 4 mujeres convivientes usan algún método anticonceptivo. En este sentido, el uso de anticonceptivos orales y de terapia de reemplazo hormonal, está muy generalizada y son dos factores que pueden predisponer a una trombosis venosa profunda en mujeres. A veces se da la condición de que algunas de estas mujeres tienen algún tipo de trombofilia, que al mezclar con los anticonceptivos orales de tipo combinado, favorece el desarrollo de esta enfermedad. Si la mujer queda embarazada se producirán en ella aún más cambios, dentro de ellos se sabe que altera la coagulación convirtiéndola en un estado de hipercoagulabilidad, aumentando el

riesgo de complicaciones como trombosis venosa profunda, tromboembolismo, muerte materna y fetal.

En la práctica obstétrica, y en el control prenatal, en ciertas mujeres se inicia una terapia de anticoagulación (principalmente si tienen problemas cardiovasculares); sin embargo la farmacoterapia puede traer consecuencias hemorragias y sangrado como efectos colaterales, por ello se continúa con la búsqueda de alternativas o coadyuvantes a este tratamiento farmacológico.

Entre estas alternativas figura la fitoterapia el uso de plantas medicinales y dentro de ella la *Cúrcuma longa* L. o “palillo”, que es utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades como antiinflamatorio, antiulceroso, antiespasmódico, detoxificante, entre otros.

Partiendo de la necesidad de obtener nuevas terapias que ayuden a las mujeres en edad fértil que consumen ACO, a las mujeres con terapia hormonal, a las mujeres gestantes a sobrellevar de mejor manera los cambios durante el embarazo, y a los hombres y mujeres en general, se creyó conveniente realizar este estudio con el objetivo de determinar el efecto anticoagulante *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Cúrcuma longa* L. de nuestro medio, en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes, entre 18 a 30 años aparentemente sanas con rangos normales de coagulación (4 - 8 Minutos), con el fin de proporcionar resultados preliminares que sirvan como base de estudios posteriores para desarrollar una alternativa terapéutica antitrombótica natural sencilla, y de bajo costo

2. PROBLEMA

¿El extracto etanólico del rizoma de *Cúrcuma longa* L. “palillo” posee efecto anticoagulante *in vitro* sobre muestras sanguíneas de mujeres jóvenes?

3. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de *Cúrcuma longa* L. “palillo” posee efecto anticoagulante sobre la sangre obtenida de mujeres jóvenes (evidenciado mediante el aumento en el tiempo de coagulación).

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto anticoagulante *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Cúrcuma longa* L. en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los componentes fitoquímicos del extracto de rizoma de *Cúrcuma longa* L.
- Determinar el tiempo de coagulación de las muestras sanguíneas por cada estímulo planteado.
- Determinar los promedios de los tiempos de coagulación con los 4 estímulos.
- Comparar los promedios de los tiempos de coagulación de los 4 estímulos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 POBLACIÓN

Mujeres jóvenes entre 18 a 30 años, procedentes, de la facultad de Derecho y Ciencias Políticas del Distrito de la Universidad Privada Antenor Orrego de la provincia de Trujillo, del Departamento de La Libertad - Perú.

1.2 MUESTRA

El tamaño de cada grupo se obtuvo en base a la siguiente fórmula estadística

$$n = \frac{2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \delta^2}{d^2}$$

Siendo:

n: tamaño de la muestra por cada grupo

$Z_{\alpha/2}$: coeficiente de confiabilidad

Z_{β} : coeficiente de potencia

δ : Desviación estándar

d: error de muestreo

Entonces:

Para $\alpha=0.05$, $Z_{\alpha/2}=1.96$ y $\beta=0.20$, $Z_{\beta}=0.842$

Igualamos $\frac{\delta^2}{\alpha^2}=1$; debido a que no existen trabajos previos

n=16

n: representa el número de personas, de las cuales se extrajeron las muestras sanguíneas y posteriormente se separaron en 4 grupos.

1.3 UNIDAD DE ANÁLISIS

Muestra sanguínea de una mujer joven.

1.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mujer entre 18 a 30 años que acepten participar del estudio.
- Con tiempo de coagulación dentro del rango normal (4 - 8 Minutos).
- Encontrarse sin molestias o síntomas, como: tos, malestar general, cefalea, dolor abdominal; sin antecedentes de enfermedad reciente como: hepatitis, paludismo, enfermedades cardíacas, o cirugías y no encontrarse recibiendo medicación actual (Métodos Anticonceptivos).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

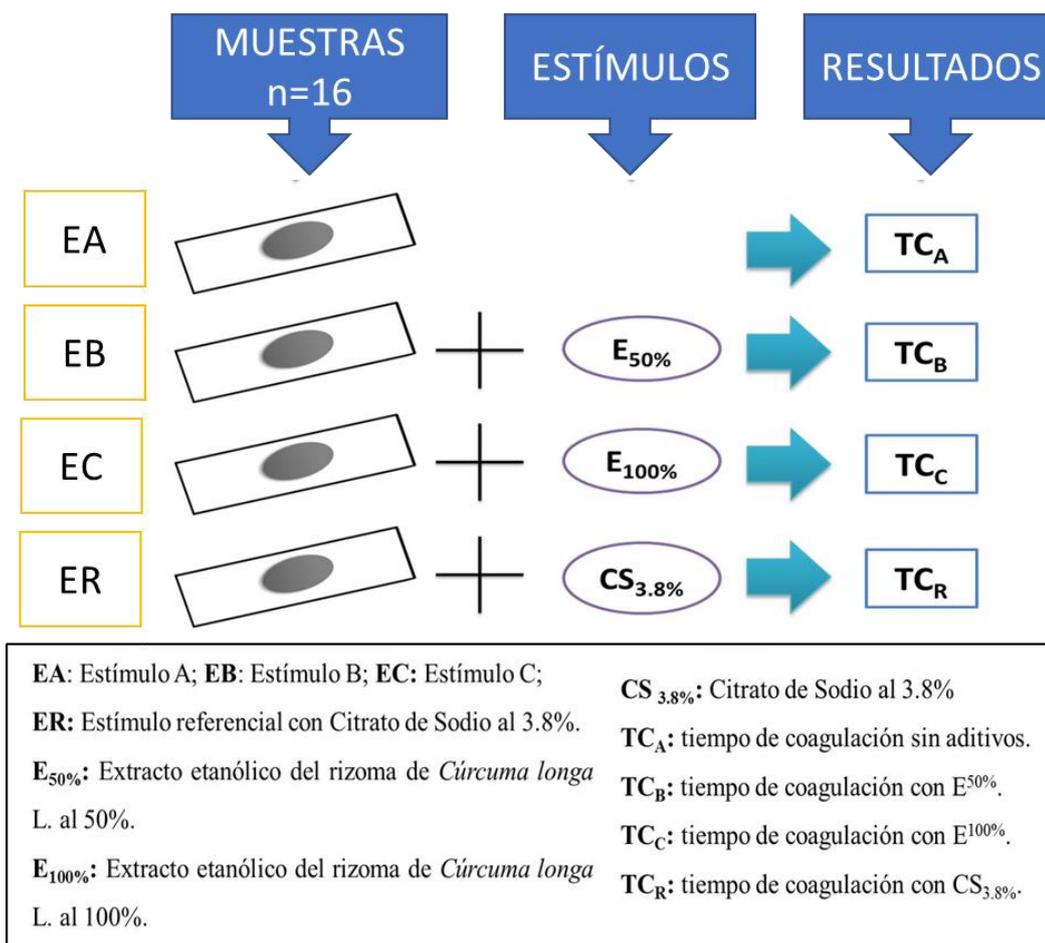
- Encontrarse embarazada, padecer de hepatopatía demostrada, paludismo, Infección por VIH, SIDA, enfermedades cardíacas, Diabetes Mellitus u obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$).

2. MÉTODO

2.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental analítico transversal.

2.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN



2.3 VARIABLES

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo y Escala
Concentración del extracto etanólico de <i>Cúrcuma longa</i> L.	Cantidad de gramos de extracto de <i>Cúrcuma longa</i> L. en 100 ml de líquido.	Porcentaje de dilución del extracto etanólico del rizoma de palillo al 100% y 50%.	mg/ml	Cuantitativa de razón
Tiempo coagulación	Prueba sanguínea que mide el tiempo que tarda la sangre en coagularse.	Minutos obtenidos mediante el método de Burker.	Minutos. (4 -8 Mn)	Cuantitativa de razón.

2.4 PROCEDIMIENTO

Descripción del procedimiento:

1. Recolección e Identificación del material Vegetal (Materia Prima), basado en Claudia Kuklinsky⁴⁷.

Los rizomas se recolectaron en el distrito de Moche, Trujillo-La Libertad, y luego se identificaron y se clasificó taxonómicamente en el museo de Historia Natural de la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO) quedando una muestra en el Herbario Antenor Orrego (HAO) (ANEXO 1).

1.1 clasificación taxonómica del material vegetal (Anexo 01):

Curcuma longa L. (Zingiberacea)

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Lilianae Takht.

Orden: Zingiberales Griseb.

Familia: Zingiberaceae Martinov

Género: *Curcuma* L.

Especie: *Curcuma longa* L.

La recolección se realizó en forma manual en el mes de enero, en cantidad necesaria para la preparación del extracto etanólico, en las primeras horas de la mañana, en época de floración, teniendo en cuenta

que es la etapa donde los rizomas están en su mayor desarrollo, permitiendo una buena calidad y cantidad de los principios activos.

2. Obtención del extracto etanólico del rizoma de *urcuma longa* L

Para la obtención del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L, se siguieron los siguientes pasos:

2.1 Selección de los rizomas:

La selección de los rizomas se realizó considerando que las características morfológicas sean similares, sin presentar: deterioro, contaminación con insectos hongos u otros elementos extraños.

2.2 Lavado y secado de los rizomas seleccionados. **Lavado**

Se lavó con agua corriente potable e inmediatamente se enjuagó con agua tratada, se estabilizó pulverizando con alcohol de 96° a una distancia aproximadamente de 80 cm sobre el material vegetal a fin de lograr detener la acción fermentativa.

Secado

Se realizó el secado de los rizomas en un horno a una temperatura de 40 a 50°C por 24 horas.

2.3 Preparación del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.

Se procedió a retirar la cáscara del rizoma, el producto se licuó con 200 ml de alcohol de 96°, luego se añadió a la mezcla otros 800 ml

de alcohol de 96°, obteniéndose un total de 1350 ml de mezcla la cual se filtró y se refrigeró a 4°C, posteriormente se llevó a un rotavapor a 80°C, el que se encargó de separar el alcohol de la parte sólida mediante condensación, obteniéndose 230 ml de extracto etanólico los cuales fueron medidos con una probeta graduada.

3. Extracción e identificación de los principales fitoconstituyentes.

3.1 Deshidratación del extracto etanólico de rizoma de *Curcuma longa* L

Para extraer e identificar los principales fitoconstituyentes primero se separó 4 volúmenes del extracto del rizoma de *Curcuma longa* L. para obtener por deshidratación 5gr de cada muestra (muestra seca).

3.2 Obtención de extractos con solventes de diferente polaridad

Se pesaron las cuatro muestras secas de material vegetal (5,0 g cada una), se empaquetó cada muestra con papel filtro y se colocaron en vasos graduados de 150 ml. A cada vaso se le agregó 30-40 ml de solvente de diferente polaridad (cloroformo, etanol, agua y HCl 1%) y se taparon con luna de reloj.

Los cuatro vasos se sometieron a calentamiento con baño maría por espacio de 5 minutos, evitando que se evapore todo el solvente. Para el caso de HCl 1% se dejó 5 minutos más. Posteriormente se realizó el ensayo cualitativo a la gota⁴⁸.

3.3 Prueba a la gota

La determinación de los fitoconstituyentes se realizó a partir de los extractos obtenidos con los solventes: cloroformo, etanol, agua y HCL 1%, utilizando el método de prueba a la gota⁴⁸.

Es un ensayo que permite determinar de manera cualitativa el tipo de metabolitos presentes en un extracto vegetal. El método consiste en someter al extracto vegetal a reactivos específicos los cuales generan compuestos coloreados⁴⁸.

3.3.1 Con extracto clorofórmico

- **Determinación de esteroides:** se realizó el ensayo de Liebermann-Burchard. A 5 gotas de extracto, se agregó 5 gotas de anhídrido acético y luego 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una coloración verde, azul, azul verdoso, violeta o roja, indicó presencia de un núcleo esteroideal o triterpenoidal⁴⁸.
- **Determinación de quinonas:** se realizó el ensayo de Borntrager. A 5 gotas del extracto, llevado a sequedad, se agregó 5 gotas de tolueno o análogos (disolver) y luego 5 gotas de NaOH al 5%. La aparición de una coloración roja, en la fase acuosa, nos indicó la presencia de antraquinonas y naftoquinonas⁴⁸.

3.3.2 Con extracto etanólico

- **Determinación de esteroides:** a 5 gotas de extracto, llevado a sequedad, se agregó 5 gotas de diclorometano o cloroformo (disolver) y se realizó el ensayo de Liebermann-Burchard⁴⁸.
- **Determinación de flavonoides:** se realizó el ensayo de Shinoda. A 5 gotas de muestra se colocó unos trocitos de magnesio metálico y luego agregar 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La coloración rojiza nos indicó la presencia de flavonoides⁴⁸.
- **Determinación de cardiotónicos:** se realizó el ensayo de Kedde. A 5 gotas de extracto agregar 3 gotas de reactivo de Kedde. La aparición de coloraciones violetas o púrpuras es prueba positiva de la existencia de cardiotónicos⁴⁸.
- **Determinación de taninos:** se realizó el ensayo de cloruro férrico o gelatina. A 5 gotas de extracto se añadió 2 gotas de solución de FeCl_3 al 10%. Una coloración azul indicó la presencia de taninos hidrolizables y una coloración verde indicó la presencia de taninos condensados⁴⁸.

3.3.3 Con extracto acuoso

- **Determinación de antocianinas:** se realizó el ensayo del pH (medio ácido y básico). A 5 gotas de extracto se añadió 3 gotas de HCl concentrado. Observar el color formado. A otra muestra de 5 gotas de extracto se añadió 3 gotas de NaOH al 5%. Las antocianinas se reconocen por producir diferentes colores a diferentes pH⁴⁸.
- **Determinación de saponinas:** se realizó el ensayo de la espuma. Colocar 3 ml de la extracto en un tubo de ensayo y agitar vigorosamente por 30 segundos, esperar 15 minutos. La persistencia de la espuma nos indicó la presencia de saponinas.
- **Determinación de Taninos:** se realizó el ensayo con cloruro férrico o gelatina⁴⁸.

3.3.4 Con extracto ácido (HCl al 1%)

- **Determinación de alcaloides:** se realizó el ensayo de Dragendorff, Meyer y Wagner. Se colocaron en 3 tubos de ensayo 1 ml de extracto ácido. Se añadió a cada uno 2 gotas de los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner. Si se observa turbidez o precipitados (rojo a naranja, blanco a crema y marrón), se consideró que la muestra contiene alcaloides⁴⁸.

4. Preparación de las diferentes concentraciones del extracto etanólico para el ensayo del tiempo de coagulación.

4.1. Preparación de la solución al 50% del *Extracto de Curcuma longa* L.

Extracto base húmeda de

Curcuma longa. L.....10 ml.

Agua destilada c.s.p10ml.

4.2. Preparación de la solución al 100% del *Extracto de Curcuma longa* L.

Extracto base húmeda de *Curcuma*

longa. L.....10ml.

Se utilizó el extracto en base húmeda para evitar la dificultad de la disolución de la muestra seca.

Los extractos fueron guardados en frasco gotero color caramelo en refrigeración para su posterior uso.

5. Determinación del tiempo de coagulación *in vitro* en sangre de mujeres jóvenes.

5.1 Método para la determinación del tiempo de coagulación

Se realizó mediante el método de Burker, cuyo tiempo referencial normal varía entre 4 a 8 minutos⁴⁹ y es el tiempo que tarda en formarse el coágulo en una muestra sanguínea

sin anticoagulante al ponerse en contacto con una superficie de vidrio.

Las muestras sanguíneas de las 16 mujeres jóvenes fueron estudiadas con los siguientes 4 estímulos:

- **Estímulo A:** (Blanco), sangre sin aditivos
- **Estímulo B:** Sangre más extracto etanólico de rizoma de *Cúrcuma longa* L. al 50%
- **Estímulo C:** Sangre más extracto etanólico de rizoma de *Cúrcuma longa* L. al 100%
- **Estímulo R:** Sangre con anticoagulante de citrato de sodio al 3.8%

5.2 Toma de muestra y determinación del tiempo de coagulación.

- a) En la lámina excavada se colocó una gota de cada estímulo (ninguno en el caso del Estímulo A) en cada pocillo, a los cuales se agregó una gota de sangre.
- b) Para la obtención de la muestra sanguínea, se desinfectó el pulpejo del dedo de la participante usando algodón embebido con alcohol al 70° y se realizó la punción con una lanceta estéril.
- c) **Al estímulo A:** se colocó una gota de sangre en el pocillo de la lámina excavada sin ningún aditivo y se puso en

marcha el cronometro (reloj). Cada 15 segundos se examinó la muestra de sangre con ayuda de la misma aguja hipodérmica hasta la observación de la formación de hilo de fibrina que se adhiere a la punta de la aguja, lo cual indicó que la sangre se ha coagulado, y en ese momento se anotó el tiempo transcurrido. Si el tiempo de coagulación se encontraba dentro del rango normal se aceptaba dicha muestra, en caso contrario hubiera quedado excluida.

- d) Al estímulo B y C:** se añadió una gota de sangre en cada pocillo de la lamina excavada que contenia los extractos al 50 % y al 100% respectivamente, se homogenizo, en ese instante se puso en marcha el cronometro ,examinando cada 15 segundos la muestra de sangre con la punta de la aguja hipodermica hasta la observacion de la formacion del hilo de fibrina, lo cual indicó que la sangre se ha coagulado y en ese instante se anoto el tiempo transcurrido
- e) Al estímulo R** se le colocó una gota de sangre en su pocillo correspondiente la cual contenia el citrato de sodio al 3.8 %, inmediatamente se puso en marcha el cronometro.
- f)** Los resultados que se obtuvieron fueron comparados con el valor normal de 4 a 8 minutos⁵⁰.

2.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Luego de la recolección, los datos fueron ordenados en una base de datos en Excel 2013 para luego ser analizados con el programa SPSS versión 23, mediante los promedios y desviación estándar de los resultados de tiempos de coagulación en los 4 estímulos, estos fueron agrupados en tablas para luego utilizar la prueba T de Student para muestras independientes a fin de determinar si existe diferencia entre las mediciones de los 4 estímulos, cruzando los datos de cada grupo y aceptándose que la diferencia será significativa cuando el valor de p sea menor de 0.05.

2.6 ASPECTOS ÉTICOS

Se solicitó aprobación previa para la ejecución del proyecto de investigación por parte de la autoridad competente de la Universidad Privada Antenor Orrego ANEXO 03. Se protegió en todo momento la confidencialidad de los datos de investigación de los participantes⁵⁰, así como también se firmó el acta de consentimiento informado, tal cual se estipula en la pauta 18 de las pautas éticas CIOMS⁵¹ en su actualización del 2009, este mismo fue redactado siguiendo las pautas del manual de procedimientos para comités institucionales de ética en investigación en el Perú. Instituto Nacional de Salud 2013.

III. RESULTADOS

El ensayo fitoquímico (Tabla 1), del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., mostró que está compuesto por quinonas, taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides, antocianinas y cardiotónicos, siendo cualitativamente predominante los taninos hidrolizables.

La muestra fue constituida por 16 mujeres jóvenes cuyo promedio de edad fue de 22.93 años (Tabla 2), quienes aceptaron participar voluntariamente del estudio.

Los tiempos de coagulación obtenidos mediante el método de Burker se midieron en minutos y se encontraron entre los valores normales (Tabla 3). El tiempo promedio de coagulación con el estímulo A fue de 5.23 minutos, y con la adición de extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. al 50% aumentó a 5.76 ± 0.85 minutos, a 89.18 ± 14.81 con extracto al 100% y con el citrato de Sodio ninguna muestra presentó coagulación (Tabla 4), obteniendo diferencia significativa cuando se compararon los resultados obtenidos en el estímulo A y B frente a la concentración de 100% del extracto de *Curcuma longa* L. (Tabla 5).

TABLA 1. COMPONENTES FITOQUÍMICOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL RIZOMA DE *Curcuma longa* L.

METABOLITO	ENSAYO	RESULTADO	CALIFICACIÓN
Taninos hidrolizables	Cloruro de Hierro (III)	Color azul	++++
Flavonoides	Shinoda	Color marrón	++++
Esteroides	Liebermann-Burchardt	Color violeta	++++
Quinonas	Borntrager	Color naranja	++++
Cardiotónicos	Kedde	Color púrpura	++++
Antocianinas	Ph	Color rosado	+++
Alcaloides	Dragendorff	Ppdo. Turbio	++
	Mayer	Ppdo. marrón	+++

Ppdo: Precipitado

++: Baja presencia de metabolitos secundarios

+++ : Mediana presencia de metabolitos secundarios

++++: Alta presencia de metabolitos secundarios

Fuente: Datos obtenidos por el equipo investigador de muestras del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma Longa* L. en el laboratorio de Química de la Universidad Privada Antenor Orrego 2016.

TABLA 2. TIEMPOS DE COAGULACIÓN DE LAS MUESTRA CON CADA ESTIMULO PLANTEADO.

	ESTÍMULO A (min)	ESTÍMULO B (min)	ESTÍMULO C (min)	ESTÍMULO R (min)
1	4.7	5.2	75	NC
2	4.8	6.3	105	NC
3	4.7	4.9	80	NC
4	4.5	5.2	100	NC
5	5.2	5.3	72	NC
6	5.5	5.5	100	NC
7	4.9	5.2	75	NC
8	6.3	6.4	100	NC
9	5.4	5.6	90	NC
10	4.2	5.7	95	NC
11	6.3	6.5	115	NC
12	6.3	7.2	110	NC
13	5.4	6.3	75	NC
14	6.5	6.5	70	NC
15	4.8	5.5	90	NC
16	4.3	4.9	75	NC
$\bar{X} \pm DE$	5.23 ± 0.76	5.76 ± 0.85	89.18 ± 14.81	NC

Estímulo A: Sangre sin aditivos.

Estímulo B: Sangre + Extracto etanólico de rizomas de Palillo al 50%.

Estímulo C: Sangre + Extracto etanólico de rizomas de Palillo al 100%.

Estímulo R: Sangre + Patrón Referencial Citrato de Sodio al 3.8%

NC: No coaguló.

\bar{X} : promedio; **DE:** Desviación Estándar.

Fuente: Datos obtenidos por el equipo investigador, de mujeres jóvenes voluntarias de la Universidad Privada Antenor Orrego de la ciudad de Trujillo, La Libertad – Perú 2016.

TABLA 3. PROMEDIOS DE LOS TIEMPOS DE COAGULACIÓN CON LOS CUATRO ESTIMULOS.

	ESTÍMULO A	ESTÍMULO B	ESTÍMULO C	ESTÍMULO R
	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$
Tiempos de coagulación	5.23 ± 0.76	5.76 ± 0.85	89.18 ± 14.81	NC

\bar{X} : promedio.

DE: Desviación Estándar.

Estímulo A: Sangre sin aditivos.

Estímulo B: Sangre + Extracto etanólico de rizomas de Palillo al 50%.

Estímulo C: Sangre + Extracto etanólico de rizomas de Palillo al 100%.

Estímulo R: Sangre + Patrón Referencial Citrato de Sodio al 3.8%

NC: No coaguló.

Fuente: Datos obtenidos por el equipo investigador, de mujeres jóvenes voluntarias de la Universidad Privada Antenor Orrego de la ciudad de Trujillo, La Libertad – Perú 2016.

TABLA 4. COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE TIEMPOS DE COAGULACIÓN CON LOS CUATRO ESTIMULOS.

	Comparación de promedios ($\bar{X} \pm DE$ vs $\bar{X} \pm DE$)	p*	Significancia
EA vs EB	5.23 ± 0.76 vs 5.76 ± 0.85	0.964	NS
EB vs EC	5.76 ± 0.85 vs 89.18 ± 14.81	<0.001	S
EA vs EC	5.23 ± 0.76 vs 89.18 ± 14.81	<0.001	S

$\bar{X} \pm DE$: Promedio ± desviación estándar

*Prueba T de Student para grupos independientes.

NS: No significativo; S: Significativo

EA: Sangre sin aditivos.

EB: Sangre + Extracto etanólico de rizomas de Palillo al 50%.

EC: Sangre + Extracto etanólico de rizomas de Palillo al 100%.

ER: Sangre + Patrón Referencial Citrato de Sodio al 3.8%

Fuente: Datos obtenidos por el equipo investigador, de mujeres jóvenes

voluntarias de la Universidad Privada Antenor Orrego de la ciudad de Trujillo, La

Libertad – Perú 2016.

IV. DISCUSIÓN

El ensayo fitoquímico del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., arrojó como resultado la presencia de taninos hidrolizables, flavonoides, esteroides, quinonas y cardiotónicos, principalmente (Tabla 1). Estos resultados obtenidos son similares a los reportados en distintos trabajos como el de Obire O, et al⁵² (Africa, 2009), quienes refieren la presencia de fenoles, flavonoides, terpenoides, y taninos en una especie de *Curcuma Longa* procedente del África. Para la especie *Curcuma*, otro trabajo también ha informado que se compone de carbohidratos (69,4%), proteínas (6,3%), grasas (5,1%) y minerales (3,5%); y además su aceite esencial contiene sabineno, cineol, borneol, zingibereno y sesquiterpenos⁵³. Shagufta N, et al⁵⁴ (Pakistan, 2010), utilizó aceite esencial de *Curcuma Longa* y encontró que los principales componentes fueron flavonoides, cardiotónicos y curcuminoides; por su parte, Satpal B, et al⁵⁵ (India, 2012), identificó flavonoides, saponinas y fenoles. Esta concordancia con los diferentes trabajos de otros continentes, es importante ya que se ha demostrado que los flavonoides y polifenoles propios de la *Curcuma*, tienen actividades inhibitoras efectivas de la agregación plaquetaria⁵⁶.

Los extractos de curcuma han demostrado seguridad en humanos debido a que se ha reportado buena tolerancia a las dosis altas de esta sustancia sin efectos secundarios significativos^{24, 57}. Por otro lado, Deshpande et al⁵⁸ (India, 2008), evaluó los efectos adversos tras el consumo de extracto etanólico de curcuma en ratas Wistar, a concentraciones de 1% y 5%, evidenciando que a los 14 días de consumo ninguna rata mostró efecto adverso alguno, contrapuesto a Kandarkar, et al⁵⁹ (India, 2008), quien realizó ensayos en ratones, a los cuales administró extracto

etanólico al 1% y 5%, reportando que a los 14 días de ingesta, estos mostraron hepatotoxicidad en el estudio histopatológico y bioquímico, por lo tanto al no existir estudios que utilicen esta planta sobre el tejido sanguíneo humano y por ser muy consumida en nuestro país, se realizó la presente investigación con extracto etanólico de *Cúrcuma longa* L. *in vitro*, para comprobar su efecto sobre la coagulación sanguínea, factor muy importante en la salud de las personas y en especial durante procesos que la alteran como el consumo de anticonceptivos y la gestación.

La muestra se conformó por un grupo de 16 mujeres jóvenes elegidas al azar mediante muestreo aleatorio simple, en aparente buen estado de salud, sin comorbilidades, con valores normales de hemostasia corroborado con el dosaje basal normal, y cuyo promedio de edad e índice de masa corporal fue de 22.9 años y 22.22 kg/m² respectivamente (Tabla 2), similar a Mayanglambam A, et al⁴⁴ (Filadelfia, 2010) quien incluyó voluntarios jóvenes sanos. La elección de un grupo de mujeres jóvenes sanas fue determinante para el estudio, pues se necesita la menor cantidad de factores influyentes sobre la coagulación, a fin de que estos no intervengan en los resultados y luego puedan ser analizados en otras poblaciones similares.

Los resultados estadísticos muestran que el extracto etanólico del rizoma de *Curcuma Longa* L. tuvo efecto anticoagulante sobre las muestras sanguíneas de mujeres jóvenes sanas, quienes tenían valores de coagulación que se encontraban en el rango de normalidad (5.23 ± 0.76 minutos)⁵⁰. Al añadir el Citrato de Sodio al 3.8% ninguna muestra coaguló, debido a que se trata de una sustancia

anticoagulante. Al agregar extracto etanólico de *Cúrcuma longa* L. al 50%, los tiempos aumentaron hasta 5.76 minutos en promedio. Sin embargo, el extracto etanólico al 100% de palillo prolongó considerablemente el tiempo de coagulación (89.18 ± 14.81 minutos), demostrando que dicho efecto es directamente proporcional a la concentración del extracto (Tablas 3 y 4).

Al respecto de los hallazgos obtenidos con *Curcuma longa* L., otros autores utilizando diferentes especies de *Curcuma*, demostraron su actividad antiplaquetaria, son: *Curcuma aeruginosa* Roxb, *Curcuma domestica* Valetton, *Curcuma mangga* Valetton y *Curcuma xanthorrhiza* Roxb, explicando los resultados debido a que la curcumina y flavonoides presentes en estas especies botánicas poseen un efecto antagonista del factor activador de plaquetas y de la coagulación^{60, 61}.

Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado en otras investigaciones, el empleo del extracto de *Cúrcuma longa* L. al 100%, aumentó significativamente el tiempo de coagulación en comparación con los otros estímulos. Al comparar el estímulo A y el B, no se encontraron diferencias significativas ($p=0.964$), sin embargo, al compararlos contra el estímulo C, los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos ($p<0.001$) (Tabla 5). En el estudio de Ramirez A, et al⁶²(Chile,2000), se empleó un total de 30 personas (16 hombres y 14 mujeres) entre 24 y 75 años de edad en aparente buena salud, quienes ingirieron 20 mg de extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* por 15 días, encontrando que los niveles de fibrinógeno disminuyeron significativamente y aumentaron los tiempos de coagulación ($p<0.011$). Por su parte, Lee H, et al⁶³ (Japón,2006), investigaron el extracto

metanólico de la *Curcuma longa* L. procedente de Seúl, haciendo uso de un modelo de agregación plaquetaria en sangre de conejos machos, encontrando que a una concentración al 10% del extracto, el porcentaje de agregación plaquetaria fue del 46% y con el extracto al 100%, la agregación plaquetaria fue inhibida totalmente ($p < 0.001$), resultados cercanos a los nuestros, ya que al 100% del extracto etanólico el promedio de tiempos de coagulación superaban los 89 minutos, un valor significativamente alto si tomamos en cuenta que el valor normal por el método de Burker es de 4 a 8 minutos. Otros autores realizaron ensayos con los compuestos del rizoma de *Curcuma longa* L., tal es el caso de Mayanglambam A, et al⁴⁴ (India,2010), en su estudio encontraron que la curcumina a una concentración del 50%, inhibía el 75% de la agregación plaquetaria en muestras sanguíneas de carnero.

Por su parte, Manikandan P, et al⁶⁴ (India,2004), informaron sobre la actividad anticoagulante de la curcumina, resultados obtenidos mediante la prolongación en los tiempos de protrombina, trombina y tromboplastina parcial activada, en muestras sanguíneas de ratas, que recibieron una dosis oral única de 15 mg/kg de curcumina. Además, Kim et al⁴⁶, (Corea,2012) publicaron que la curcumina prolongó el tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activada de forma significativa e inhibieron las actividades de trombina y factor X activado, ellos realizaron un estudio *in vitro*, utilizando extracto etanólico al 80% aplicado en ratas macho en forma de pretratamiento, durante 14 días con 300 mg/kg de *Curcuma longa* L.

También se han realizado investigaciones con otras formas de preparación; en el trabajo de Prakash P, et al⁴⁵ (India,2011), se utilizó aceite esencial de *Curcuma*, aplicado a roedores, demostrando que el aceite esencial posee efecto antiagregante plaquetario mediante la inhibición de difosfato de adenosina (ADP) y trombina, obteniendo reducción al 31% de la agregación plaquetaria, y prolongando en un 18 a 25% el tiempo de sangrado. Al respecto de este modelo de investigación, otro ensayo con curcumina (procedente de *Curcuma Longa L.*), se llevó a cabo en 2012, en esta investigación los tiempos de sangrado de los ratones fueron mayores a 15 minutos, utilizando una dosis de 300 mg/kg, concluyendo que la curcumina inhibía las vías extrínsecas e intrínsecas de la coagulación de la sangre mediante la inhibición de Factor X activado y trombina⁶⁵.

Para comprender los mecanismos por los cuales actúan los metabolitos de *Curcuma Longa L.*, debemos primero saber que la agregación plaquetaria es un fenómeno complejo que probablemente involucra varias vías bioquímicas intracelulares. Las plaquetas se activan mediante una serie de agonistas fisiológicos, tales como ácido araquidónico, colágeno, factor activador de plaquetas o trombina, para luego agregarse unas entre otras⁶⁶. Debido a que esta activación se produce por diversas sustancias, las plaquetas pueden precipitar la formación de trombos, dando lugar a enfermedades procoagulantes. Además, las interacciones entre las plaquetas y endotelio vascular, resulta importante en el desarrollo de trombosis y enfermedades cardiovasculares⁸.

Cuando se produce un daño en el endotelio se expone el colágeno subendotelial, este se une a las plaquetas mediante dos receptores: 1B/V/IX o el factor VI, a los que se unirá el Factor de Von-Willebrandt, a esto se le conoce como adhesión plaquetaria, posteriormente la plaqueta posee vesículas que contienen glicoproteínas IIb/IIIa necesarias para la agregación plaquetaria⁶⁷.

El calcio dentro de los gránulos plaquetarios produce la formación de tromboxano A₂ (Tx A₂) en el citosol por activación enzimática. El TxA₂ recién formado y el ADP se unen a receptores que activan adenosina monofosfato cíclico haciendo que el Calcio intracitoplasmático reaccione y genere movimiento de microtúbulos, los cuales movilizarán la glicoproteína IIb/IIIa hacia la membrana plaquetaria dejándola expuesta y disponible para la agregación plaquetaria. Por lo tanto cualquier alteración en alguno de estos factores resultará en un efecto antiagregante plaquetario⁹.

La curcumina está presente en los rizomas de *Curcuma longa* L., en la investigación de Rahman A, et al⁶⁸ (Suecia, 2014), demostraron que la curcumina bioactiva se concentraba en la médula del rizoma de la planta; además fueron positivos todos los componentes principales del palillo en el rizoma, resultado similar al de Kanjana S, et al⁶⁹ (India,2016), quienes recientemente reportaron que la curcumina representa la principal molécula activa del rizoma de esta planta.

Los estudios con curcumina, han demostrado que esta posee efecto antiagregante, Rao C, et al⁷⁰ (Estados Unidos, 2005), concluyen que la cúrcuma prolonga el tiempo de coagulación sanguínea mediante disminución de la actividad catalítica de la Fosfolipasa A₂ y Fosfolipasa C, por consiguiente disminuye la liberación de ácido

araquidónico intracelular; años más tarde, Ramsewak R, et al (Estados Unidos, 2000)⁷¹ y Goel A, et al⁷² (Estados Unidos, 2001), demostraron que la cúrcuma actúa mediante la inhibición de la expresión de ciclo-oxigenasa 2, necesario para la formación de TxA2 desde el ácido araquidónico.

De manera similar Shah B, et al⁷³ (Pakistan, 2009), estudiaron el efecto de la cúrcuma en la coagulación, demuestran que este metabolito actúa inhibiendo la formación de tromboxano y la señalización del calcio, este hecho no permitiría la formación de TxA2, necesario para la activación y agregación plaquetaria. Otros trabajos apoyan la idea anterior, concluyendo que la curcumina, la cual sería rápidamente metabolizada y conjugada en el hígado⁷⁴, es capaz de interactuar con numerosas moléculas implicadas en la coagulación^{75, 76}, como lo es la ciclooxigenasa-2.

Chainani N, et al⁷⁷ (Pakistan,2003), estudió el aceite esencial de *Curcuma longa*, sus resultados informan que la curcumina redujo la agregación plaquetaria inducida por trombina, colágeno y ADP, y no de otra forma, por lo tanto sugiere que el efecto antiplaquetario sea probablemente producido a nivel membrana/receptor .Estos mecanismos concuerdan con Daveluy A, et al⁷⁸ (India,2014), quienes encuentran que es posible que la curcuma interfiera con anticoagulantes orales antagonistas de la Vitamina K (Flunidona), debido a que aumentó la Razón normalizada internacional (INR), haciendo importante el hecho de preguntar a los pacientes si están agregando curcuma a su dieta.

Por lo anterior, el aumento en el tiempo de coagulación logrado en los grupos a los cuales se añadió extracto de *Curcuma Longa* L. se demuestra que esta especie botánica posee actividad anticoagulante, dependiente de la concentración y es debido posiblemente a sus componentes como la curcumina, flavonoides, cardiotónicos, taninos hidrolizables y terpenos, que actúan por diferentes mecanismos y en distintas fases de la coagulación, ya sea inhibiendo las vías extrínsecas e intrínsecas (inhibición del Factor Xa), mediante la inhibición de la generación de trombina o antagonizando la agregación plaquetaria. Por otro lado, estudios en donde especies de *Curcuma* demuestran efectos procoagulantes, no han sido concluyentes en base al mecanismo de acción, estos resultados podrían explicarse por el método diferente utilizado, además de haber sido aplicados sobre heridas superficiales, en donde podrían actuar otros metabolitos de la curcuma que puedan acelerar la cicatrización⁴⁷. Por lo tanto, nuestros resultados se suman a los hallazgos previos y apoyan el hecho que esta especie puede ser útil para el diseño racional de estrategias farmacológicas, representando una alternativa sencilla y de bajo costo para hacer frente al estado de hipercoagulabilidad, propio del embarazo, en otras enfermedades trombóticas.

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo” posee efecto anticoagulante *in vitro* sobre muestras sanguíneas de mujeres jóvenes.
- El extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo” presenta principalmente taninos hidrolizables, flavonoides, esteroides, quinonas y cardiotónicos.
- Las mujeres participantes tenían en promedio 22.93 años y 22.22 Kg/m² de índice de masa corporal.
- Los tiempos de coagulación *in vitro* de las muestras sanguíneas sin aditivos y con extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. al 50% se encontraron entre 4.3 y 7.2 minutos respectivamente, y con extracto al 100% entre 72 y 115 minutos.
- Los promedios de tiempos de coagulación para cada estímulo fueron 5.23 (sin aditivos), 5.76 (extracto al 50%) y 89.18 minutos (extracto al 100%), y con citrato de sodio 3.8% no hubo coagulación.
- El tiempo de coagulación *in vitro* de las muestras sanguíneas con extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. al 100% fue estadísticamente superior al tiempo logrado en el grupo sin aditivos y con extracto al 50%.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar los estudios del efecto anticoagulante de *Curcuma longa* L. (palillo) con diferentes dosis y concentraciones.
- Ampliar el estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. (análisis espectrofotométrico), así como la cuantificación de curcumina.
- Se recomienda ampliar los estudios de seguridad del consumo de extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. al 100%.
- Se recomienda realizar ensayos sobre muestras sanguíneas de diferentes poblaciones de mujeres tales como usuarias de anticonceptivos orales, con terapias de reemplazo hormonal, gestantes, entre otras.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo, in Technical Report Series. OMS. Geneva; 2007.
2. Figueredo E, Pérez M, Reyes A. Nuevas consideraciones en el tratamiento del tromboembolismo pulmonar. *Revista Cubana de Medicina*. 2016; 55(3): 41-6.
3. Vantman D, Vega M. Reproductive physiology and evolutive changes with women age. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2010; 21(3): 348-62.
4. Arevalo N, Vivas D, Calvachi P. Peripartum cardiomyopathy. *Rev Colomb Cardiol*. 2017; 24(3): 299e1-8.
5. Perú, Instituto Nacional de Estadística e Informática. Encuesta demográfica y de salud familiar-ENDES. Lima: INEI; 2014.
6. Romero M, Rodríguez L, Vásquez J. Programa Formativo de la Especialidad de Enfermería Obstétrico Ginecológica: Embarazo. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, España. 2014.
7. Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochemia Medica (Zagreb)*. 2012; 22(1): 49-62.
8. Flores O, Ramírez K, Meza J, Nava J. Fisiología de la coagulación. *Rex Mex Anest*. 2014; 37(2): 382-6.
9. Matínez C. Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2006; 44 (2): 51-8

10. Maegele M, Schöchl H, Cohen M. An update on the coagulopathy of trauma. *Shock*. 2014; 41(1): 21-5.
11. Versteeg H, Heemskerk J, Levi M, Reitsma P. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013; 93(1): 327-58.
12. Galvez K, Cortes C. Tromboelastography: new concepts in haemostasis physiology and correlation with trauma associated coagulopathy. *Rev Colomb Anesthesiol*. 2012; 40(3): 224-30.
13. Goland S, Elkayam U. Anticoagulation in pregnancy. *Cardiol*. 2012; 30(8): 395-405.
14. Sánchez L, Fonseca L, Capiro T, Fernández F. Propuesta de una ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Rev Cubana Farm*. 2000; 34(1): 34-43.
15. Tanigushi S, Imayoshi Y, Yazaki K, Yoshida T. Hydrolysable Tannin Production in *Oenothera tetraptera* Shoot Tissue Culture. *Plant Biotechnology*. 2002; 19(5): 357-63.
16. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra: OMS; 2002.
17. Arroyo C, Angulo Y. Publicaciones estudiantiles sobre propiedades medicinales de las plantas en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2009; 26(4): 585-6.

18. Briggs W, Folts J, Osman H, Goldman I. Administration of raw onion inhibits platelet-mediated thrombosis in dogs. *J Nutr.* 2001; 131(10): 2619-22.
19. Guh J, Ko F, Jong T, Teng C. Antiplatelet effect of gingerol isolated from *Zingiber officinale*. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995; 47(4): 329-32.
20. Torres C, Guzmán L, Moore R, Palomo I. Efecto antitrombótico, una característica poco conocida de las frutas y hortalizas. *Revista Chilena de nutrición* 2008; 35: 10-17.
21. Torres C, Guzmán L, Schmeda G, Moore R, Alarcón M, Astudillo L. Antiplatelet, anticoagulant, and fibrinolytic activity *in vitro* of extracts from selected fruits and vegetables. *Blood coagul Fibrinolysis.* 2011; 22 (3): 197-205.
22. Zarzosa E, Loja B, Salazar A, Inocente M. Efecto sobre el sistema de la coagulación del zumo de frutas y hortalizas peruanas. *Horiz Med.* 2015; 15(2): 6-11.
23. Clapé O, Castillo A. Avances en la caracterización farmacotoxicológica de la planta medicinal *Curcuma longa* Linn. *MEDISAN.* 2011; 16(1): 97-114.
24. Singh G, Kapoor I, Singh P, De Heluani C, de Lampasona M, Catalan C. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn). *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(4): 1026-31.

25. Pulido M, Moreno J, Ramirez C, Ramirez M. Curcumin and Health. *Molecules*. 2016; 21(3): 264-75.
26. Nagarathnam R, Rengasamy A, Balasubramanian R. Purification and properties of cysteine protease from rhizomes of *Curcuma longa* Linn. *J Sci Food Agric*. 2010; 90(1): 97-105.
27. Thong D, Choochuai S, Patumraj S, Chayanupatkul M, Klaikeaw N. Curcumin prevents indomethacin-induced gastropathy in rats. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(13): 1479-84.
28. Rahimi R, Abdollahi M. Herbal medicines for the management of irritable bowel syndrome: a comprehensive review. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(7): 589-600.
29. Yadav S, Sah A, Jha R, Sah P, Shah D. Turmeric (curcumin) remedies gastroprotective action. *Pharmacogn Rev*. 2013; 7(13): 42-6.
30. Kim J, Ha H, Moon H, Lee Y, Cho C, Yoo H, et al. Chemopreventive effect of *Curcuma longa* Linn on liver pathology in HBx transgenic mice. *Integr Cancer Ther*. 2011; 10(2): 168-77.
31. Lin Y, Lin C, Chi C, Huang Y. Study on antifibrotic effects of curcumin in rat hepatic stellate cells. *Phytother Res* 2009; 23(7): 927-32.
32. Somanawat K, Thong D, Klaikeaw N. Curcumin attenuated paracetamol overdose induced hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(12): 1962-7.

33. Lee H, Li L, Kim H, Bilehal D, Li W, Lee D, et al. The protective effects of *Curcuma longa* Linn. Extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats via upregulation of Nrf2. *J Microbiol Biotechnol.* 2010; 20(9): 1331-8.
34. El-Bahr S. Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1. *Phytother Res.* 2015; 29(1): 134-40.
35. Mukherjee S, Roy M, Dey S, Bhattacharya R. A mechanistic approach for modulation of arsenic toxicity in human lymphocytes by Curcumin an active constituent of medicinal herb *Curcuma longa* Linn. *J Clin Biochem Nutr.* 2007; 41(1): 32-42.
36. Ravindran J, Subbaraju G, Ramani M, Sung B, Aggarwal B. Bisdemethylcurcumin and structurally related hispolon analogues of curcumin exhibit enhanced prooxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities *in vitro*. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(11): 1658-66.
37. Mazidi M, Karimi E, Meydani M, Ghayour M, Ferns G. Potential effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor- γ *in vitro* and *in vivo*. *World J Methodol.* 2016; 6(1): 112-7.
38. Nonn L, Duong D, Peehl D. Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. *Carcinogenesis.* 2007; 28(6): 1188-96.

39. Mito S, Watanabe K, Harima M, Thandavarayan R, Veeraveedu P, Sukumaran V, et al. *Curcumin* ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34(7): 974-9
40. Wilken R, Veena M, Wang M, Srivatsan E. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2011; 7(10): 12-31.
41. Prasad S, Tyagi A. Curcumin and its analogues: a potential natural compound against HIV infection and AIDS. *Food Funct.* 2015; 6(11): 3412-9.
42. Nagarathnam R, Rengasamy A, Balasubramanian R. Purification and properties of cysteine protease from rhizomes of *Curcuma longa* Linn. *J Sci Food Agric.* 2010; 90(1): 97-105.
43. Mayanglambam A, Dangelmaier C, Thomas D, Damodar Reddy C, Daniel J, Kunapuli S. Curcumin inhibits GPVI-mediated platelet activation by interfering with the kinase activity of Syk and the subsequent activation of PLCgamma2. *Platelets.* 2010; 21(3): 211-20.
44. Prakash P, Misra A, Surin WR, Jain M, Bhatta RS, Pal R, et al. Anti-platelet effects of Curcuma oil in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion and thrombosis. *Thromb Res.* 2011; 127(2): 111-8.
45. Kim M, Oh I, Jun D, Lee J, Sohn H, Kwak D, et al. Anticoagulant and Fibrinolytic Activities of Hwanggeumchal Sorghum *In Vitro.* *Journal of Life Science.* 2013; 23(12): 1460-70.

46. Shivalingu B, Vivek H, Nafeesa Z, Priya B, Swamy S. Comparative analysis of procoagulant and fibrinolytic activity of crude protease fractions of turmeric species. *J Ethnopharmacol.* 2015. 22; 172: 261-4.
47. Kuklinski C. *Farmacognosia estudio de drogas y sustancias medicamentosas de origen natural.* Editorial Omega. Barcelona, España. 2003.
48. Dominguez X, Alcorn J. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of north eastern Mexico. *J Ethnopharmacol.* 1985; 13(2): 139-56.
49. Ministerio de Salud. *Manual de hemoterapia.* 1era edición. Lima, Perú. Instituto Nacional Materno Perinatal; 2008.
50. Ley que establece los Derechos de las personas usuarias de los servicios de la salud Ley N° 29414. Perú 2009
51. Ferrer M. Pautas CIOMS 2009 para Estudios Epidemiológicos: La extensión del paradigma biomédico. *Revista Red bioética/UNESCO.* 2011; 2(4): 26-33.
52. Obire R, Anuagasi C, Amadi J, Ukpabi U. Potential inhibitory effects of some African tubereous plant extracts on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *IJIB.* 2009; 6(2): 91-8.
53. Chattopadhyay I, Biswas K, Badyopadhyay U, Banargee R. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Current Science.* 20014; 87(1): 45-53

54. Shagufta N, Safia J, Saiqa I, Farkhanda M, Farah A, Amir A. Antibacterial activity of *curcuma longa* varieties against different strains of bacteria. Pak J Bot. 2010; 42(1): 455-62.
55. Satpal B, Priya R, Rojita M, Amrita P, Praveen B. Antimicrobial properties of few plants used in traditional system of medicine. IJRAP. 2012; 3(4): 563-4.
56. Tsai I, Lin W, Teng C, Ishikawa T, Doong S, Huang M. Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. Planta Med. 2000; 66(7): 618-23.
57. Ireson C, Jones D, Orr S, Coughtrie M, Boocock D, Williams M, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002; 11(3): 105-11.
58. Deshpande S, Lalitha V, Ingle A, Raste A, Gadre S, Maru G. Subchronic oral toxicity of tumeric and ethanolic tumeric extract in female mice and rats. Toxicol Lett. 2008; 95(2): 183-93.
59. Kandarkar S, Sawant S, Ingle A, Deshpande S, Maru G. Subchronic oral hepatotoxicity of turmeric in mice: histopathological and ultrastructural studies. Indian J Exp Biol. 2008; 36: 675-9.
60. Jantan I, Pizar M, Sirat H, Basar N, Jamil S, Ali R, et al. Inhibitory effects of compounds from Zingiberaceae species on platelet activating factor receptor binding. Phytother Res. 2004; 18(12): 1005-7.

61. Jantan I, Rafi I, Jalil J. Platelet-activating factor (PAF) receptor-binding antagonist activity of Malaysian medicinal plants. *Phytomedicine*. 2005; 12(1-2): 88-92.
62. Ramirez A, Soler A, Carrión M, Pamies D, Pardo J, Diaz J, et al. An hydroalcoholic extract of *Curcuma longa* lowers the abnormally high values of human-plasma fibrinogen. *Mech Ageing Dev*. 2000; 114(3): 207-10.
63. Lee H. Antiplatelet property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived ar-turmerone. *Bioresour Technol*. 2006; 97(12): 1372-6.
64. Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, Manohar B, Lokanadam B, Puvanakrishnan R. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(10): 1967-80.
65. Kim D, Ku S, Bae J. Anticoagulant activities of curcumin and its derivative. *BMB Rep*. 2012; 45(4): 221-6.
66. Versteeg H, Heemskerk J, Levi M, Reitsma P. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013; 93: 327-58.
67. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*. 2014; 58(5):515-23.
68. Rahman A, Angawi R, Kadi A. Spatial localisation of curcumin and rapid screening of the chemical compositions of turmeric rhizomes (*Curcuma longa* Linn.) using Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry (DART-MS). *Food Chem*. 2015; 173: 489-94.

69. Kanjana S, Piya K, Kanitta J, Wannee J. Antithrombotic activity of turmeric (*Curcuma longa*): A review. *Indian J Agric Res.* 2016; 50(2): 101-6.
70. Rao C, Rivenson A, Simi B, Reddy B. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res.* 2005; 55(8): 259-66.
71. Ramsewak R, DeWitt D, Nair M. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine.* 2000; 7(3): 303-8.
72. Goel A, Boland C, Chauhan D. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2001; 172(2): 11-8.
73. Shah B, Nawaz Z, Pertani S, Roomi A, Mahmood H, Saeed S, et al. Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca^{+2} signaling. *Biochem Pharmacol.* 2009; 58(2): 1167-72.
74. Ireson C, Orr S, Jones D, Verschoyle R, Lim C, Luo J, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res.* 2001; 61(3): 1058-64.

75. Goel A, Kunnumakkara A, Aggarwal B. Curcumin as “curcumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(1): 787-809
76. Shpitz B, Giladi N, Sagiv E, Levi S, Liberman E, Kazanov D, et al. Celecoxib and curcumin additively inhibit the growth of colorectal cancer in a rat model. *Digestion*. 2006; 74(3-4): 140-4
77. Chainani N. Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med*. 2003; 9(1): 161-8.
78. Daveluy A, Géniaux H, Thibaud L, Mallaret M, Miremont G, Haramburu F. Probable interaction between an oral vitamin K antagonist and turmeric (*Curcuma longa*). *Thérapie*. 2014; 69(6): 519-20.

ANEXOS

ANEXO 1

Identificación Taxonómica de la *Curcuma Longa* L. en el museo botánico de la universidad Privada Antenor Orrego.



UPAO

Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 02-2017-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

Que Karo Mercedes Villalta Valderrama y Jenny García Correa, bachilleres en Obstetricia de la Universidad Privada Antenor Orrego, han solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

Curcuma longa L. (Zingiberaceae)

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Liliales Takht.

Orden: Zingiberales Griseb.

Familia: Zingiberaceae Martinov

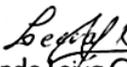
Género: *Curcuma* L.

Especie: *C. longa* L.

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Efecto coagulante *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. "palillo" en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes".

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines correspondientes.




Segundo Leiva González
DIRECTOR
MUSEO DE HISTORIA NATURAL Y CULTURAL

Trujillo, 16 de enero de 2017

ANEXO 2

ENSAYO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL RIZOMA DE *Curcuma longa* L.

ENSAYO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Autor: Guillermo León Aponte

Nombre de la planta: Curcuma longa L.

Parte usada: Rizoma

Fecha: 30 Enero 2017.

Ensayo	CHCl ₃ Color: Amarillo claro	EtOH Color: Naranja	H ₂ O Color: Amarillo claro	HCl 1% Color: Amarillo claro
Quinonas	++++ Color: Naranja			
Esteroides	++++ Color: Violeta	Color:		
Flavonoides		++++ Color: Marron claro		
Cardiotónicos		++++ Color: Púrpura		
Taninos <i>hidrolizables</i>		++++ Color: Azul	Color: OH ⁻ +++ Color: Rosado H ⁺ + Color: Amarillo tenue	
Antocianinas			Altura: -	
Saponinas				
Alcaloides				D +++ Ppdo: Marron
				M ++ Ppdo: Turbio
				W - Ppdo: -

ANEXO 3

CONTROL DE CALIDAD DEL PULVERIZADO DEL RIZOMA DE

Curcuma longa L.

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Textura	Suave uniforme
Olor	Aromático
Sabor	Ácido, picante
Color	Amarillo

Fuente: Datos obtenidos por el equipo investigador de muestras del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma Longa* L., en el laboratorio de química de la Universidad Privada Antenor Orrego.

ANEXO 4

HOJA INFORMATIVA

Título: Efecto coagulante *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Cúrcuma longa* L. “palillo” en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes.

Autoras: Jenny García Correa con DNI: 03691162 y Karo Mercedes Villalta Valderrama con DNI: 41100714.

Objetivo principal del estudio: Evaluar el efecto Anticoagulante *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Cúrcuma longa* L. en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes.

Estimado participante: Para efectos de la investigación se le extraerá unas gotas de sangre capilar del pulpejo de un dedo, siguiendo todos los procedimientos correctos a fin de no causarle molestias adicionales. Luego se analizará el tiempo de coagulación mediante el método de Burker, dato que se le informará al término del estudio.

RECUERDE:

1. Su participación no conlleva riesgos personales., caso contrario el personal investigador corre con todos los pormenores.
2. No recibirá ninguna compensación económica por participar.
3. Su identidad será protegida mediante un código asignado desde el momento de la recolección de la muestra y los resultados serán de uso exclusivo para la investigación.
4. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria y es libre de retirarse de la misma sin previa explicación de los motivos.
5. Cualquier información al respecto de la investigación se le será brindada.

ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo:

Identificada con DNI N°:

He leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, pero se me explicó acerca de la protección de datos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha:

Firma del Investigador

ANEXO 5

Autorización de la Universidad Privada Antenor Orrego para la realización del proyecto de investigación.



UPAO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

RESOLUCIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA N°005-2017-UPAO

Trujillo, 30 de mayo de 2017

VISTO, el oficio de fecha 29-V-2017 presentado por los alumnos GARCÍA CORREA, JENNY; VILLALTA VALDERRAMA, KARO quien solicita autorización para realización de investigación.

CONSIDERANDO:

Que por oficio, el alumnos GARCÍA CORREA, JENNY; VILLALTA VALDERRAMA, KARO solicita se le de conformidad a su proyecto de investigación, de conformidad con el Reglamento del Comité de Bioética en Investigación de la UPAO.

Que en virtud de la Resolución Rectoral N° 3335-2016-R-UPAO de fecha 7 de julio de 2016, se aprueba el Reglamento del Comité de Bioética que se encuentra en la página web de la universidad, que tiene por objetivo su aplicación obligatoria en las investigaciones que comprometan a seres humanos y otros seres vivos dentro de estudios que son patrocinados por la UPAO y sean conducidos por algún docente o investigador de las Facultades, Escuela de Posgrado, Centros de Investigación y Establecimiento de Salud administrados por la UPAO

Que en el presente caso, después de la evaluación del expediente presentado por el alumno, el Comité Considera que el mencionado proyecto no contraviene las disposiciones del mencionado Reglamento de Bioética, por tal motivo es procedente su aprobación.

Estando a las razones expuestas y de conformidad con el Reglamento de Bioética de Investigación:

PRIMERO: APROBAR el proyecto de investigación "EFECTO COAGULANTE *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL RIZOMA *Curcuma longa* Linn "Palillo" EN MUESTRAS SANGUINEAS EN MUJERES JOVENES"

SEGUNDO: dar cuenta al Vice Rectorado de Investigación.

Regístrese, Comuníquese y Archívese.



Dr. Víctor Hugo Chanduví Cornejo

Presidente



Dr. José González Cabeza

Secretario

ANEXO 6

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Título: “Efecto coagulante in vitro del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo” en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes”

CÓDIGO: _____

✓ **EDAD:**

✓ **PESO:**

✓ **TALLA:**

Actualmente padece de:

- Hepatopatía: SI () NO ()
- Paludismo: SI () NO ()
- VIH/SIDA: SI () NO ()
- Enfermedad cardiaca: SI () NO ()
- Diabetes Mellitus: SI () NO ()
- ¿Está tomando alguna medicación? SI () NO ()

TIEMPOS DE COAGULACIÓN

BLANCO	CON EXTRACTO AL 50%	CON EXTRACTO AL 100%	CON CITRATO DE SODIO 3.8%

FECHA: ____/____/____

ANEXO 7

Fotografías del estudio



Análisis fitoquímico del extracto.



Resultados y análisis fitoquímico final del extracto etanólico del rizoma de palillo.



Obtención de los tiempos de coagulación de la sangre extraída en cada concentración del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma long.*