

Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE Y
FIBRINOLÍTICA *in vitro* DEL EXTRACTO DEL TALLO DE
Ananas sativus L. (piña). Arequipa 2018”.**

Tesis presentada por la Bachiller:

Chuquitarqui Quispe, Lizeth Magaly

Para optar el Título Profesional de:

Químico-Farmacéutica

Asesor: **QF. Torres Vela, Fernando**

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000049462

N° Trámite en Fac. 1730-2017

Fecha 31-10-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: CHUQUITARQUI QUISPE, Lizeth Magaly

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE Y FIBRINOLITICA in vitro DEL EXTRACTO DEL TALLO DE Ananas sativus L. (Piña). AREQUIPA 2017"

DICTAMINADORES: 1) Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar 2) Q. F. Mocita De La Fuente Torres

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE Y FIBRINOLITICA in vitro DEL EXTRACTO DEL TALLO DE Ananas sativus L. (Piña). AREQUIPA 2018"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firmas :

(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha 10/07/2018

ASESOR: Q. F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: **"DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE Y FIBRINOLITICA in vitro DEL EXTRACTO DEL TALLO DE Ananas sativus L. (Piña). AREQUIPA 2018"** y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

Firma

Fecha 19.08.2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas**
- 2) **Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar**

3) **Mgter. Mocita De La Fuente Torres**

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrentes, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma

(Devolver antes de 15 días hábiles)

Fecha 13/11/2019

JURADOS: Presidente DR. JOSE VILLANUEVA SALAS
Vocal DRA. ROXANA GUTIERREZ ARANIBAR
Secretario MAG. MOCITA DE LA FUENTE TORRES

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 11/10/19

Hora: 19.00

Local: C- 402 (SUM)

DECANO

DEDICATORIAS

Dedico y agradezco esta tesis a:

Dios por su amor puro, por darme fuerza, fe y haberme guiado a lo largo de este camino; dándome la fortaleza para afrontar los diversos desafíos que se me presentaron.

A mis padres Sixto Chuquitarqui Ramírez y Felicitas Quispe Velásquez por su amor, su ejemplo, consejos y valores, por motivarme a seguir adelante y por todo el esfuerzo y sacrificio que permitieron que hoy culmine una gran etapa.

Con cariño dedico a mi familia hermanos y seres queridos, por motivarme, porque creyeron en mí, brindándome su apoyo, y consejos incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Brindarles mi mayor gratitud a todos mis docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, por el tiempo brindado y todas las enseñanzas y consejos aportados a mi formación profesional y personal durante toda mi carrera universitaria.

Agradecer a mi asesor Dr. Fernando Torres Vela por el gran apoyo que me brindó y por todos sus consejos que sirvieron para realizar y culminar este trabajo.

A mis dictaminadores quienes se merecen mi especial reconocimiento por el interés mostrado por la investigación y las sugerencias recibidas a cada uno de ellos Dr. José Villanueva Salas, Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar y Dra. Mocita De La Fuente Torres, por sus sabios consejos, su ayuda incondicional y experiencia me dieron la clave para culminar esta meta de manera satisfactoria, gracias por su valiosa participación en mi formación profesional por su orientación, paciencia y la adquisición de conocimientos que me ofrecieron a lo largo de mi tesis.

Expresar también agradecimiento al personal de laboratorio por su apoyo y colaboración durante la realización del trabajo de investigación.

INTRODUCCIÓN

Los factores de riesgo cardiovascular pueden dividirse en dos grandes grupos: los factores de riesgo no modificables (edad, sexo, raza y antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular) y los potencialmente modificables (hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión arterial, tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo y obesidad) (1).

Junto a los factores modificables, la población en base al autocuidado incorpora terapias destinadas a mejorar su salud cardiovascular, y con relación a este tipo de enfermedades la fitoterapia ocupa un lugar importante, plantas como el ajo, las hojas de olivo, se utilizan contra las dislipidemias y la hipertensión arterial, respectivamente, sin embargo, al igual que la farmacoterapéutica, los anticoagulantes y fibrinolíticos forman parte del abanico de posibilidades farmacológicas para el tratamiento de estos trastornos.

Como anticoagulante y/o fibrinolítico, los tallos, específicamente los pedúnculos de *Ananas sativus* (piña) son muy conocidos por sus propiedades sobre la sangre, pero en cuanto a los especímenes que crecen y cuyos frutos se comercializan con fines alimenticios en nuestro país no hay trabajos disponibles sobre esta actividad de la droga anticoagulante de *Ananas sativus* (piña), razón por la cual este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad anticoagulante y fibrinolítica del extracto de *Ananas sativus* (piña), el texto de esta investigación se describen paso a paso el proceso seguido para la obtención de los extractos de la droga, detallando el método extractivo así como los resultados de dicho proceso.

Al ser una investigación relacionada con el tratamiento de enfermedades, la investigación debe iniciar con su fase preclínica, razón por la cual este estudio trata de una indagación *in vitro*, la que se hizo en sangre humana con el apoyo de voluntarios, los procedimientos de evaluación están descritos, además, de la bioestadística imprescindible en la investigación experimental.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como principal objetivo determinar la actividad anticoagulante y fibrinolítica *in vitro* del extracto del tallo de *Ananas sativus* L., conocido comúnmente como piña, en muestras de sangre humana.

La primera acción a realizar fue la recolección de los tallos del fruto, esta se realizó en el Distrito de Huepetuhe, Provincia de Manu, Departamento de Madre de Dios, esta planta fue seleccionada y transportada a la ciudad de Arequipa, en donde fue tratada hasta obtener un polvo semifino para la extracción.

Se obtuvo dos tipos de extractos según el método de extracción, el primer extracto fue mediante equipo Soxhlet, utilizando como disolvente alcohol etílico de 96°; el segundo extracto fue mediante percolación, utilizando como disolvente alcohol etílico de 70°.

La evaluación fitoquímica preliminar se realizó mediante la cromatografía en capa fina del extracto del tallo de *Ananas sativus* (piña) obtenido mediante destilación con Soxhlet, en la que se determinó mediante la reacción general, la presencia de metabolitos secundarios para la reacción de terpenos se detectó la presencia de saponinas, triterpenos y esteroides; la reacción para taninos fue positiva; en cambio la reacción para flavonoides y alcaloides fue negativa.

Para la evaluación del efecto anticoagulante y fibrinolítico se tuvo que obtener sangre humana proveniente de 12 sujetos voluntarios, siguiendo los criterios de inclusión establecidos en el presente estudio. Posteriormente se tuvo también que realizar diluciones de ambos extractos, obteniéndose tres disoluciones de cada tipo, a saber: al 20, 14 y 8%.

El efecto anticoagulante se evaluó mediante dos métodos. El primero fue el tiempo de coagulación, los resultados para este método y el análisis estadístico a un nivel de confianza del 95% en comparación al control, señaló como extractos eficaces a los extractos obtenidos por Soxhlet en concentración al 20 y 14%, junto con el extracto obtenido por percolación al 20%.

El segundo método para evaluar el efecto anticoagulante *in vitro* del extracto de *Ananas sativus* o piña fue mediante la medición del tiempo de protrombina, bajo los mismos parámetros estadísticos establecidos para el presente estudio, se tuvo como extractos eficaces a los extractos obtenidos por Soxhlet en concentración al 20 y 14%, junto con el extracto obtenido por percolación al 20%.

Finalmente se realizó la evaluación del efecto fibrinolítico, en este ensayo no se observó eficacia fibrinolítica del extracto del tallo de *Ananas sativus* o piña, ya que ninguno de los dos tipos de extractos en sus tres concentraciones mostró efecto fibrinolítico, por no mostrar diferencias significativas con el grupo control.

Palabras claves: Anticoagulante, fibrinolítico, extracto.

ABSTRACT

The main objective of this research was to determine the *in vitro* anticoagulant and fibrinolytic activity of the extract of the stalk of *Ananas sativus* L., commonly known as pineapple, in human blood samples.

The first action to be performed was the collection of the stalk of the fruit, this was done in the District of Huepetuhe, Province of Manu, department of Madre de Dios, this drug was selected and transported to the city of Arequipa, where it was treated until obtain a semi-fine powder for extraction.

Two types of extracts were obtained according to the extraction method, the first extract was by Soxhlet equipment, using as solvent 96 ° ethyl alcohol; the second extract was by percolation, using 70 ° ethyl alcohol as solvent.

The preliminary phytochemical evaluation was performed by thin layer chromatography of the extract of the stem of *Ananas sativus* (pineapple) obtained by distillation with Soxhlet, in which it was determined by the general reaction, the presence of secondary metabolites for the terpene reaction was detected the presence of saponins, triterpenes and steroids; the reaction for tannins was positive; On the other hand, the reaction for flavonoids and alkaloids was negative.

For the evaluation of the anticoagulant and fibrinolytic effect, human blood had to be obtained from 12 volunteer subjects, following the inclusion criteria established in the present study. Subsequently, dilutions of both extracts also had to be obtained, obtaining three solutions of each type, namely: at 20, 14 and 8%.

The anticoagulant effect was evaluated by two methods. The first was the coagulation time, the results for this method and the statistical analysis at a confidence level of 95% compared to the control, indicated as extracts effective extracts obtained by Soxhlet in concentration at 20 and 14%, together with the extract obtained by percolation at 20%.

The second method to evaluate the anticoagulant effect *in vitro* of the extract of *Ananas sativus* or pineapple was by measuring the prothrombin time, under the same statistical parameters established for the present study, extracts were obtained as extracts obtained by Soxhlet in concentration at 20 and 14%, together with the extract obtained by percolation at 20%.

Finally, the evaluation of the fibrinolytic effect was carried out. In this test, no fibrinolytic efficacy of the extract of the *Ananas sativus* or pineapple stalk was observed, since none of the two types of extracts in their three concentrations showed a fibrinolytic effect, as they did not show significant differences with the control group

Key words: *Anticoagulant, fibrinolytic, extract.*



ÍNDICE

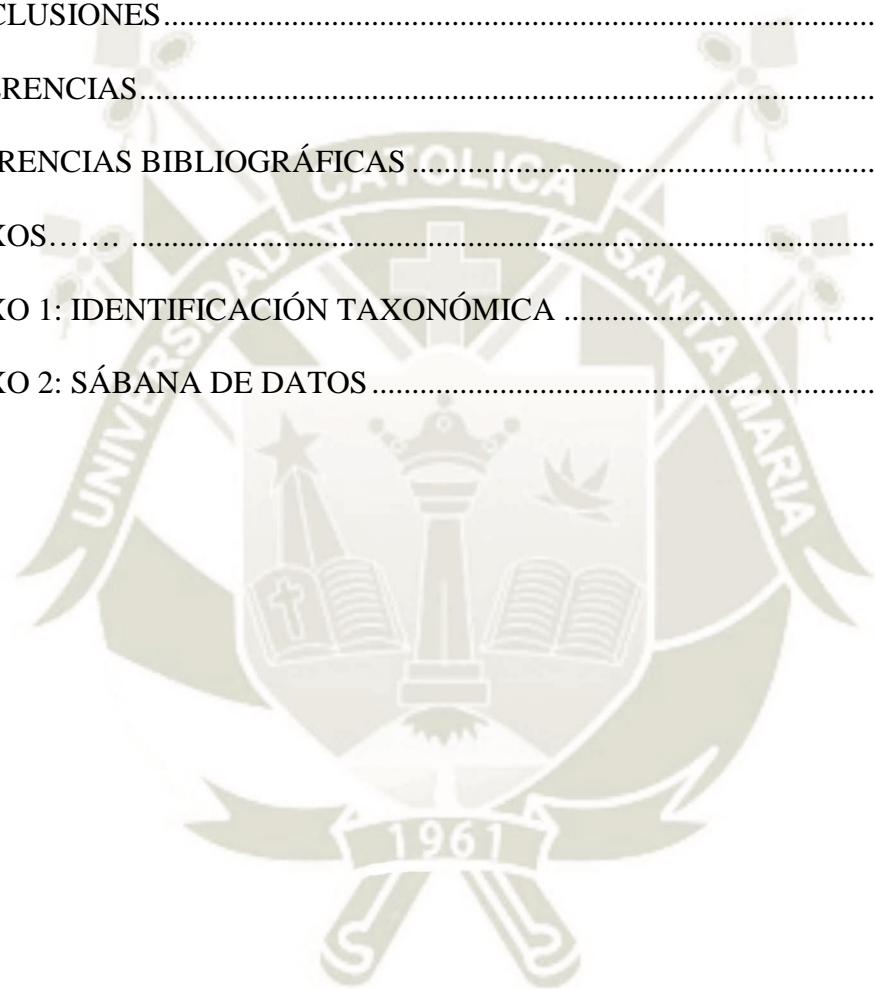
DEDICATORIAS	
AGRADECIMIENTOS	
INTRODUCCIÓN	
RESUMEN	
ABSTRACT	
OBJETIVOS	
HIPÓTESIS	
CAPÍTULO 1	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. PIÑA	1
1.1.1. Nombre científico	1
1.1.2. Sinonimias científicas	1
1.1.3. Descripción botánica	1
1.1.4. Hábitat	2
1.1.5. Clasificación Taxonómica	3
1.1.6. Parte utilizada	3
1.1.7. Composición química	4
1.1.8. Composición alimentaria	4
1.1.9. Usos medicinales	4
1.1.10. Otras propiedades y usos	5
1.1.11. Cultivo	5
1.2. HEMOSTASIA	5
1.2.1. Vasoconstricción	6
1.2.2. Formación del tapón plaquetario	6

1.2.3. Formación del coágulo.....	7
1.2.4. Proliferación.....	9
1.3. MECANISMOS ANTIHEMOSTÁTICOS.....	9
1.3.1. Factores que inhiben la agregación plaquetaria	10
1.3.2. Factores que inhiben la coagulación	10
1.3.3. Factores que producen fibrinólisis	11
1.4. FÁRMACOS ANTICOAGULANTES.....	11
1.4.1. Heparina y Derivados.....	11
1.4.1.1 Química.....	11
1.4.1.2 Distribución.....	12
1.4.1.3 Clases de heparina:.....	12
1.4.1.4 Mecanismo de acción:.....	13
1.4.1.5 Farmacocinética	13
1.4.1.6 Indicaciones.....	14
1.4.1.7 Contraindicaciones	14
1.4.1.8 RAMS:	14
1.4.2. Warfarina.....	15
1.4.2.1 Mecanismo de Acción.....	15
1.4.2.2 Indicaciones.....	15
1.4.2.3 Farmacocinética	16
1.4.2.4 Contraindicaciones	16
1.4.2.5 RAMS.....	16
1.4.2.6 Interacciones Medicamentosas.....	16
1.4.3. Agentes Descalcificantes	16
1.4.4. Mecanismo de Acción.....	17

1.4.4.1 Farmacocinética	17
1.4.4.2 Indicaciones.....	18
1.4.4.3 Toxicidad.....	18
1.5. FÁRMACOS TROMBOLÍTICOS	18
1.5.1. Acción general de los agentes trombolíticos:.....	18
1.5.2. Farmacocinética General.....	19
1.5.3. Indicaciones de los Agentes Trombolíticos:	19
1.5.4. RAMS de los Agentes Trombolíticos	19
1.5.5. Contraindicaciones de los trombolíticos:.....	20
1.5.6. Estreptocinasa	20
1.5.7. Urocinasa (Uk).....	20
CAPÍTULO 2	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1. LUGAR DE REALIZACIÓN.....	22
2.2. MATERIALES	22
2.2.1. Materiales y equipos de laboratorio	22
2.2.1.1 Utillaje de laboratorio.....	22
2.2.1.2 Equipos de laboratorio	23
2.2.1.3 Reactivos	23
2.2.1.4 Otros materiales.....	24
2.2.2. Materiales biológicos	24
2.3. MÉTODOS	25
2.3.1. Metodología de investigación científica	25
2.3.1.1 Tipo de estudio	25
2.3.1.2 Diseño de estudio	25

2.3.1.3 Población.....	25
2.3.1.4 Muestra.....	25
2.3.1.5 Plan de muestreo	25
2.3.1.6 Asignación aleatoria de la muestra.....	25
2.3.2. Métodos de Farmacognosia.....	26
2.3.2.1 Recolección	26
2.3.2.2 Selección	26
2.3.2.3 Estabilización	27
2.3.2.4 Dsecación	27
2.3.2.5 Trituración.....	27
2.3.2.6 Extracción.....	28
2.3.3. Métodos de Fitoquímica.....	30
2.3.3.1 Método de cromatografía en capa fina.....	30
2.3.4. Métodos de Análisis Clínicos	33
2.3.4.1 Obtención de las muestras de sangre.....	33
2.3.4.1.1 Punción venosa.....	33
2.3.4.1.2. Punción cutánea.....	34
2.3.4.2 Diluciones de los extractos para la evaluación.....	34
2.3.4.3 Evaluación de la actividad anticoagulante	35
2.3.4.4 Evaluación de la actividad fibrinolítica.....	37
2.3.5. Métodos de Análisis de datos.....	38
CAPÍTULO 3	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	40
3.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	42

3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICOAGULANTE.....	45
3.3.1. Tiempo de coagulación, Método de Burker.....	45
3.3.2. Tiempo de protrombina, Método de Quick.....	48
3.4. ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA	52
3.4.1. Método de Prasad	52
CONCLUSIONES.....	56
SUGERENCIAS.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS.....	63
ANEXO 1: IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	64
ANEXO 2: SÁBANA DE DATOS	65



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Fases móviles para la Cromatografía en capa fina	31
Tabla N° 2: Dilución del extracto de piña a distintas concentraciones	34
Tabla N° 3: Extracción mediante Soxhlet y su rendimiento	40
Tabla N° 4: Extracción mediante Percolación y su rendimiento.....	41
Tabla N° 5: Tiempo de coagulación (minutos), Método de Burker	45
Tabla N° 6: ANOVA para el Tiempo de coagulación (minutos), Método de Burker.....	46
Tabla N° 7: Test HSD Tukey para el Tiempo de coagulación (minutos), Método de Burker	47
Tabla N° 8: Tiempo de Protrombina (segundos), Método de Quick.....	48
Tabla N° 9: ANOVA Tiempo de Protrombina (segundos), Método de Quick	49
Tabla N° 10: Test HSD Tukey del Tiempo de Protrombina (segundos), Método de Quick	50
Tabla N° 11: Peso medio en gramos del coágulo post administración de tratamientos.....	52
Tabla N° 12: Análisis de Varianza Peso medio en gramos del coágulo post administración de tratamientos.....	53
Tabla N° 13: Test HSD Tukey Peso medio en gramos del coágulo post administración de tratamientos	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: <i>Ananas sativus</i> (piña)	3
FIGURA N° 2: Cascada de coagulación.....	9
FIGURA N° 3: Estructura de la Heparina	12
FIGURA N° 4: Estructura de la Warfarina.....	15
FIGURA N° 5: Recolección de <i>Ananas Sativus</i> (piña)	26
FIGURA N° 6: Tallo de <i>Ananas Sativus</i> (piña).....	26
FIGURA N° 7: Muestra triturada del tallo de <i>Ananas Sativus</i> (piña)	27
FIGURA N° 8: Extracción mediante soxhlet del tallo de <i>Ananas Sativus</i> (piña).....	29
FIGURA N° 9: Extracción mediante Percolación de tallo de <i>Ananas Sativus</i> (piña)	30
FIGURA N° 10: Extracción de sangre venosa	33
FIGURA N° 11: Formación de hilo de Fibrina	35
FIGURA N° 12: Formación de coagulo	37
FIGURA N° 13: Actividad fiblinolitica.....	38
FIGURA N° 14: Extractos de <i>Ananas Sativus</i> (piña)	40
FIGURA N° 15: Identificación general	43
FIGURA N° 16: Identificación de terpenos	44
FIGURA N° 17: Identificación de taninos	44
FIGURA N° 18: Grafico del tiempo de coagulación en minutos	46
FIGURA N° 19: Grafico del tiempo de protrombina	49
FIGURA N° 20: Gráfico de la actividad fiblinolitica.....	53

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad anticoagulante y fibrinolítica *in vitro* del extracto del tallo de *Ananas sativus* (piña).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos y determinar el rendimiento de la droga (tallos) de *Ananas sativus* (piña).
- Analizar el extracto de *Ananas sativus* (piña) mediante cromatografía en capa fina y determinar que metabolitos secundarios se encuentran en dicho extracto.
- Determinar la actividad anticoagulante *in vitro* del extracto de *Ananas sativus* (piña) mediante la medición del tiempo de coagulación y tiempo de protrombina sobre sangre venosa humana.
- Determinar la actividad fibrinolítica *in vitro* del extracto de *Ananas sativus* (piña) mediante la medición según el método descrito por Prasad sobre sangre venosa humana.

HIPÓTESIS

Dado que en el saber popular se atribuye efecto anticoagulante al tallo de la piña (*Ananas sativus*) es probable que los extractos del tallo de la piña muestren efecto anticoagulante y fibrinolítico *in vitro* sobre muestras de sangre venosa humana.



CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. PIÑA

1.1.1.Nombre científico

Ananas sativus L. (2).

1.1.2.Sinonimias científicas

Se citan 35, entre ellas: *A. comosus* (L) Merr, y *Bromelia comosa* L. (3).

1.1.3.Descripción botánica

Planta cultivada extensamente por el sabor agradable y la utilidad de la fruta. Hierba con muchas hojas rosuladas, lineales, de aproximadamente 1 metro de largo y de 1.5 a 5 centímetros de ancho, lepidotas en ambas caras en la base envainadora, el ápice espinoso, los márgenes muy armados de agujones córneos, encorvados, de aproximadamente 3 milímetros de largo (4).

La flor en inflorescencia de la piña se caracteriza por ser una espiga que se origina en el meristemo apical del tallo. Al momento de la floración el tallo se alarga y forma el pedúnculo que sostiene y separa la inflorescencia de las hojas de la planta.

Las brácteas de la piña se forman en espiral alrededor del tallo y disminuyen de tamaño a medida que avanzan hacia el ápice, son bastante conspicuas y, al igual que las hojas, presentan espinas rojas en sus márgenes y poseen coloraciones rojizas en el haz (5).

En la axila de cada una de las brácteas que constituyen la inflorescencia existe una yema floral en forma de cojín de color rojo pálido. La diferenciación floral se produce en sentido acropetal, observándose diferentes estados florales a lo largo de la inflorescencia (5).

En la flor abierta la corola exhibe una estructura tubular con pétalos de color violeta. En las etapas finales de la diferenciación floral, se aprecia en el ápice de la inflorescencia un conjunto de hojas verdes pequeñas, con espinas y dispuestas en espiral, las cuales constituirán la hoja del fruto (5).

La piña posee un fruto múltiple denominado sorosis, cuya parte carnosa está constituida por la fusión de los tejidos de los frutos individuales y del eje de la inflorescencia. De cada una de las flores se desarrollan los frutos individuales que aparecen hacia el exterior en forma de escudetes, los cuales constituyen la corteza dura y cerosa del fruto. Al momento de la cosecha los frutos presentan una coloración general marrón brillante y el borde de los escudetes se encuentra delineado por una tonalidad amarillo-verde. El fruto en estado maduro es de pulpa blanca a amarillo muy pálido, aromático, carnoso, jugoso y de sabor dulce. En el tamaño final de los frutos de piña se observa una alta variabilidad, resultado del vigor de la planta, las condiciones de desarrollo y el carácter silvestre de la variedad (5).

1.1.4.Hábitat

Amazonía y zonas tropicales y subtropicales de todos los continentes (6).

Silvestre y cultivada, la forma silvestre se ha encontrado en Brasil, Norte del Perú (San Martín) y Bolivia. Un tiempo se creía que era originaria de Asia. Se ha introducido en todos los continentes (6).



FIGURA N° 1: *Ananas sativus* (piña)

1.1.5. Clasificación Taxonómica

La siguiente clasificación taxonómica fue realizada en el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, cuya constancia se recoge en el Anexo N° 1 del presente estudio.

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Commelinidae
- Orden: Poales
- Familia: Bromeliaceae
- Género: *Ananas*
- Especie: *Ananas sativus* L.

1.1.6. Parte utilizada

Tallos y fruto.

1.1.7. Composición química

Enzimas: bromelaina (mezcla de bromelinas A y B). La misma está presente en mayor medida en los frutos inmaduros, siendo su presencia entre escasa y nula en la zona central y periférica del fruto. Abunda en los tallos, de los cuales también se ha aislado tiol-proteínas (pectasas, invertasas). La bromelaina se obtiene por ultrafiltración fraccionada y liofilización subsiguiente del jugo exprimido del tallo de ananá maduro. Su actividad se lleva a cabo tanto en medio ácido, alcalino o neutro (especialmente este último) (3).

Glúcidos (10%): sacarosa, fructosa, glucosa (3).

Otros: Vitaminas A, B, C y E, ácidos orgánicos, fibras: celulosa, hemicelulosa y lignina (en los tallos o corazón), ácido salicílico 6 µg (en el almíbar), ésteres del ácido cinámico, compuestos fenólicos en el jugo (S-sinapil-l-cisteína, entre otros), oxalato de calcio (pulpa agridulce del fruto) (3).

1.1.8. Composición alimentaria

Cada 100 g contiene calorías 57 (en conserva 95); hidratos de carbono 14 g; proteínas 0.4 g; fibra 1g; sodio 1 mg; calcio 17 mg; hierro 0.5 mg; fósforo 8 mg; potasio 146 mg; provitamina A 70 UI; vitamina B1 0.09 mg; vitamina B2 0.03 mg; vitamina B6 0.08 mg; vitamina C 20-60 mg; ácido fólico 9µg; colesterol 0 g; ácido úrico 0g; ácido oxálico 30 mg (3).

1.1.9. Usos medicinales

El fruto de la piña se usa en dispepsias hiposecretoras. El corazón de la piña se ha preconizado como coadyuvante en regímenes de adelgazamiento, por su contenido en fibra, con acción saciante y ligeramente laxante (7).

Indicaciones aprobadas por la Comisión E para la bromelaina: edemas postoperatorios y postraumáticos y especialmente en el caso de sinusitis nasales y paranasales. La bromelaina también se emplea en forma tópica para la limpieza de heridas y úlceras tróficas (7).

1.1.10. Otras propiedades y usos

Alimento: frutos maduros de muchas formas (crudo, en mermeladas, en jugos, seco, etc.). Preparación de chicha, alcohol y vinagre. Industrialmente la pulpa se utiliza en la fabricación de conservas de molido, crush o compota; jugo y concentrado. Los principales productos elaborados son jugos, néctares, mermeladas, trozos en almíbar, zumos enlatados de pulpa, vino y vinagres (6).

Forraje: Los subproductos de la industria son utilizados para alimento de vacunos, cerdos y peces (6).

Fibra: el mesófilo de las hojas contiene fibras de diverso tamaño, fuertes, resistentes y de color blanco, se utilizan en textilería fina de alto valor comercial (6).

Ornamental: Las inflorescencias jóvenes (6).

1.1.11. Cultivo

Se reconocen básicamente tres cultivares:

Española: Frutos de pulpa blanca, peso 0.7-1.4 Kg, calidad del fruto regular (6).

Queen: Fruto de pulpa amarillo intenso, peso de 0.45- 7.0 Kg, calidad mejor que la española (6).

Cayenne: fruto de pulpa amarillo pálido, peso de 2.3 a 3.6 Kg, cilíndricos y de excelente calidad para el enlatado (6).

En el Perú, la variedad de ecotipos cultivados en la selva, básicamente provienen de estos tres cultivares y tienen denominaciones locales (6).

1.2. HEMOSTASIA

La hemostasia es el proceso por el cual se forman coágulos en las paredes de los vasos sanguíneos dañados que impide la pérdida de la sangre mientras esta se mantenga en estado líquido dentro del sistema vascular. Un conjunto de mecanismos sistémicos complejos interrelacionados opera para conservar el equilibrio entre la coagulación y la anticoagulación (8).

Siempre que se corta o se rompe un vaso, se llega a la hemostasia por varios mecanismos 1) el espasmo vascular; 2) la formación de un tapón de plaquetas; 3) la

formación de un coágulo sanguíneo como resultado de la coagulación sanguínea, y 4) la proliferación del tejido fibroso en el coágulo sanguíneo para cerrar el agujero en el vaso de manera permanente (9).

1.2.1. Vasoconstricción

Inmediatamente después de que se haya cortado o roto un vaso sanguíneo, el estímulo del traumatismo de la pared del vaso hace que el músculo liso de la pared se contraiga; esto reduce instantáneamente el flujo de sangre del vaso roto (9). La contracción es el resultado de: 1) un espasmo miógeno local; 2) los factores autacoides locales procedentes de los tejidos traumatizados y de las plaquetas sanguíneas, y 3) los reflejos nerviosos se inician a partir de impulsos nerviosos de dolor u otros impulsos sensoriales que se originan en los vasos con traumatismos o en tejidos cercanos. Pero probablemente se produce aun una mayor vasoconstricción por la contracción miógena local de los vasos sanguíneos iniciada por el daño directo de la pared vascular. Y en los casos más pequeños, las plaquetas son las responsables de la mayor parte de la vasoconstricción, porque liberan una sustancia vasoconstrictora, el *tromboxano A2* (9).

1.2.2. Formación del tapón plaquetario

La formación del tapón plaquetario inicia cuando las plaquetas entran en contacto con las fibras de colágeno subendoteliales (fibras de colágeno que se ubican bajo el endotelio de los vasos sanguíneos) que se exponen como resultado de una lesión. El tapón plaquetario se forma en cuatro fases: adhesión plaquetaria, activación plaquetaria, agregación plaquetaria y contracción plaquetaria (10).

La adhesión plaquetaria requiere la presencia del vWF, una glucoproteína que secretan las células del endotelio vascular y se encuentra en el plasma. Cuando el endotelio se interrumpe, el vWF circulante se une a las fibras de colágeno subendoteliales expuestas. Al unirse al colágeno, el vWF se modifica de tal manera que adquiere capacidad para unirse a la GP Ib que se ubica en la superficie de las plaquetas. De esa manera, el vWF ancla a la plaqueta al colágeno subendotelial (10).

La activación plaquetaria hace referencia al incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} que se presenta dentro de la plaqueta una vez que ésta se ancla al

colágeno a través del vWF. El contacto con colágeno activa mecanismos hormonales del grupo II-C dentro de la plaqueta. El inositol trifosfato (IP₃, segundo mensajero de las hormonas del grupo II-C) que se sintetiza desencadena la liberación de Ca²⁺ del sistema tubular denso de las plaquetas hacia el citosol. Las plaquetas activadas se contraen (por efecto de la activación de la interacción actina-miosina), forman pseudópodos (por medio de la reorganización de los microtúbulos), descargan sus gránulos (como resultado de la exocitosis mediada por Ca²⁺) y desarrollan otro tipo de integrina en su superficie, que se llama GP IIb-IIIa (10).

La elevación de Ca²⁺ durante la activación de la plaqueta también induce la síntesis del tromboxano A₂ al interior de esa estructura. El tromboxano A₂ induce, una elevación adicional de Ca²⁺ en el citosol. De esa manera, se produce un ciclo de retroalimentación positiva de activación plaquetaria. El ADP que secretan los gránulos densos contribuye a la activación de las plaquetas al inducir al tromboxano A₂ (10).

Agregación plaquetaria. La GP IIb-IIIa en la superficie de la plaqueta se une a la trombospondina, una proteína de adhesión que secreta el trombocito. La GP IIb-IIIa también se une al fibrinógeno que existe en el plasma. La agregación plaquetaria se presenta por efecto de la formación de puentes cruzados entre la trombospondina y el fibrinógeno (10).

1.2.3. Formación del coágulo

El tercer mecanismo de la hemostasia es la formación del coágulo sanguíneo. El coágulo empieza aparecer en 15 a 20 segundos si el traumatismo de la pared vascular ha sido grave y en 1 a 2 minutos si el traumatismo ha sido menor. Las sustancias activadoras de la pared vascularizada inician el proceso de coagulación (9).

El proceso de coagulación de la sangre consiste en la transición del estado líquido a la formación de un gel. En el proceso de coagulación de la sangre se forma una red de fibrina estable y plaquetas, que engloba eritrocitos, leucocitos y suero. Un coágulo intravascular se denomina trombo. Los trombos o fragmentos de un trombo a arrastrados por la circulación se denominan émbolos. La proteasa trombina que cataliza la proteólisis del fibrinógeno a monómeros de fibrina, desempeña un papel central en la coagulación. Los monómeros de fibrina polimerizan espontáneamente y dan lugar a un polímero de fibrina. La trombina actúa sobre el factor denominado factor XIII y lo activa. El factor XIII activado (XIIIa) produce entrecruzamientos en el polímero de fibrina, formando una red de fibrina

estable. La trombina activa las plaquetas a través de un receptor plaquetario. Las plaquetas activadas ofrecen una superficie óptima para la coagulación (11).

La trombina se encuentra normalmente en el plasma en forma de un precursor, la protrombina. La conversión de la protrombina en trombina requiere un complejo formado por los siguientes elementos: fosfolípidos, factor V activado (Va), factor X activado (Xa) y Ca^{2+} . Una vez que se ha producido la trombina ella misma participa en la conversión de protrombina en trombina y en la activación del factor V, así como en otras reacciones de la coagulación. El proceso de formación de trombina se denomina vía final común de la coagulación. La activación del factor X, necesaria para la conversión de protrombina en trombina, puede ocurrir a través de dos vías denominadas vía intrínseca y vía extrínseca. Esta última es la más importante en el organismo (11).

En la vía extrínseca de la coagulación, la activación del factor X se produce a través de un complejo formado por el denominado factor tisular, el factor VII activado (VIIa) y el Ca^{2+} . El factor tisular se encuentra normalmente en células extravasculares y es un receptor del factor de coagulación plasmático VII. La activación del factor VII es una activación no proteolítica debida a la unión del factor a su receptor. Normalmente, el factor VII no tiene acceso al factor tisular, situado en la membrana de las células extravasculares. Cuando se lesiona el endotelio y el factor VII se une al factor tisular, se produce la activación. En casos de inflamación, el factor tisular también se expresa en células intravasculares como en los monocitos y las células endoteliales, lo que aumenta considerablemente el riesgo de coagulación (11).

En la denominada vía intrínseca la activación del factor X requiere la participación de un complejo formado por fosfolípidos, factor VIII activado (VIIIa), factor IX activado (IXa) y Ca^{2+} . Cuando la sangre entra en contacto con la superficie de las plaquetas activadas o con una superficie artificial cargada negativamente como la de un tubo de vidrio, el factor de coagulación XII experimenta activación (XIIa). Una molécula de las plaquetas, denominada cininógeno de alto peso molecular, favorece la unión del factor XII a la membrana plaquetaria. El factor XII, una vez activado, transforma la precalicreína en calicreína, y ésta contribuye adicionalmente a la activación del factor XII. El factor XIIa activa el factor IX (IXa) a través del factor XI. El factor IXa activa el factor VIII. El factor VIII es también activado por la trombina, (Figura 2) (11).

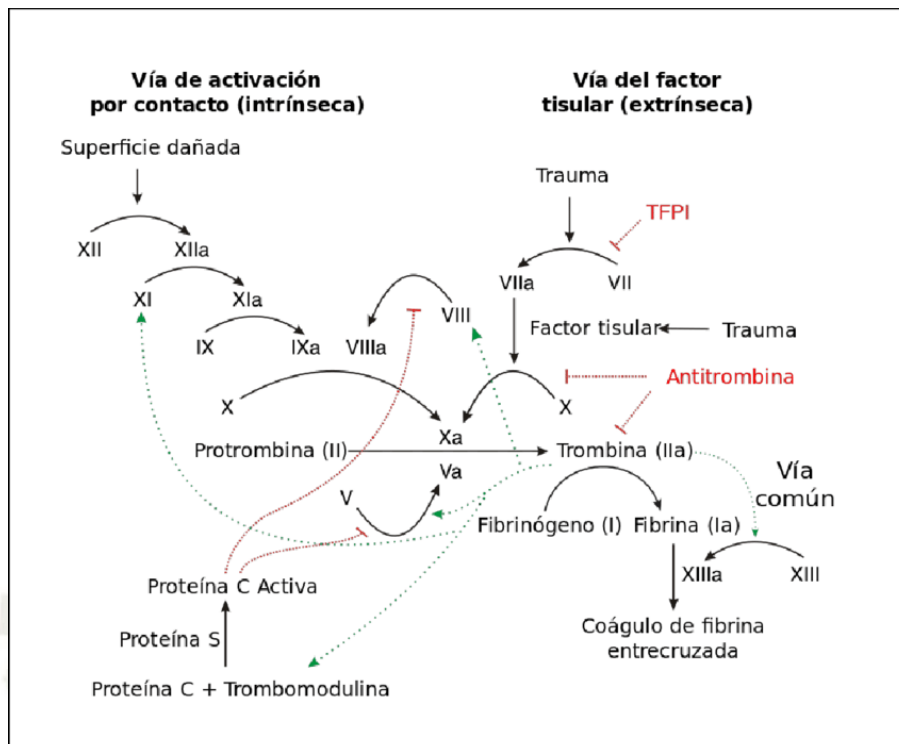


FIGURA N° 2: Cascada de coagulación

1.2.4. Proliferación

Una vez que se ha formado el coágulo sanguíneo, puede suceder una de estas dos cosas: 1) pueden invadirlo los fibroblastos, que después formarán tejido conjuntivo por todo el coágulo, o 2) puede disolverse. La evolución habitual de un coágulo que se forma en un agujero pequeño de una pared vascular es la invasión de los fibroblastos, empezando pocas horas después de que se formara el coágulo (lo que promueve al menos parcialmente el factor de crecimiento que segregaron las plaquetas). Este proceso continúa hasta la organización completa del coágulo en tejido fibroso en aproximadamente 1 a 2 semanas (9).

A la inversa, cuando pasa sangre a los tejidos y aparecen coágulos allí donde no eran necesarios, se activan sustancias especiales que hay dentro del coágulo. Estas sustancias funcionan como enzimas que disuelven el coágulo, como se expondrá más adelante (9).

1.3. MECANISMOS ANTIHEMOSTÁTICOS

La tendencia de la sangre a la coagulación se equilibra in vivo mediante mecanismos endógenos antihemostatísicos, que impiden que se formen coágulos dentro de

los vasos sanguíneos y disuelven cualquiera que se desarrolle. Además, existen mecanismos antihemostásicos endógenos que se explotan con fines terapéuticos (10).

1.3.1. Factores que inhiben la agregación plaquetaria

Por lo general, existe un equilibrio delicado entre el tromboxano A₂, que promueve la agregación plaquetaria, y la prostaciclina (PGI₂), que la inhibe. El tromboxano A₂ se sintetiza en las plaquetas; la PGI₂ se forma en las células endoteliales. Ambas sustancias se producen por medio de la vía de la ciclooxygenasa, por la oxidación del ácido araquidónico. La PGI₂ estimula a la ciclasa del adenilato de la membrana e incrementa las concentraciones de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) dentro de las plaquetas. El cAMP estimula a la adenosintrifosfatasa (ATPasa) del calcio (Ca²⁺) y con ello incrementa el bombeo de este ion hacia el sistema tubular denso dentro de la plaqueta, lo que tiene por consecuencia la disminución de su concentración en el citosol. Así, la PGI₂ impide la activación plaquetaria; el tromboxano A₂ reduce los niveles de cAMP en las plaquetas, y genera el efecto opuesto (10).

1.3.2. Factores que inhiben la coagulación

Vía metabólica de la proteína C. Tres factores proteicos (la proteína C, trombomodulina y proteína S) constituyen una vía de retroalimentación negativa importante que mantiene bajo control la coagulación. La proteína C se activa por efecto de los factores Xa y trombina. La proteína C activada inactiva a los factores VIIIa y Va, que son los dos elementos clave para la formación de la trombina y el factor Xa. Para su inactivación se requiere la presencia de dos cofactores, la proteína S y trombomodulina. La proteína S y C se encuentran en el plasma. La trombomodulina es una proteína que se encuentra en el endotelio vascular (10).

Sistema antitrombina-heparina. La antitrombina III se encuentra en el plasma y el endotelio vascular. Inactiva varios factores de la coagulación, entre ellos la trombina. El sulfato de heparina sólo se encuentra en el endotelio vascular. Inhibe tanto la producción de trombina (a partir de la protrombina) y la acción de la trombina (sobre el fibrinógeno). La heparina potencia la antitrombina III (10).

1.3.3. Factores que producen fibrinólisis

La sangre se mantiene en estado fluido gracias a mecanismos que disuelven la fibrina que pueda formarse esporádicamente en los vasos. La fibrina estable de un trombo puede ser hidrolizada por la proteasa plasmina. La plasmina se encuentra en el plasma y se acumula en el coágulo en forma de un precursor inactivo sintetizado en el hígado, denominado plasminógeno. La conversión de plasminógeno en plasmina corre a cargo del activador tisular del plasminógeno (t-PA) o del activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA). Este último actúa unido a un receptor de la membrana celular. El endotelio produce el factor tisular activador del plasminógeno. Las catecolaminas y la bradicinina aumentan los niveles circulantes del activador tisular del plasminógeno. La presencia de fibrina acelera la conversión del plasminógeno en plasmina (11).

El endotelio sintetiza un inhibidor de los activadores del plasminógeno (t-PA y u-PA) denominado PAI-1. La placenta produce un inhibidor del u-PA denominado PAI-2. Este último, durante el embarazo, aumenta el riesgo de coagulación. La proteína C inhibidora de la coagulación inhibe las proteínas PAI-1 y PAI-2, favoreciendo la fibrinólisis (11).

1.4. FÁRMACOS ANTICOAGULANTES

1.4.1. Heparina y Derivados

En 1916, el estudiante de medicina J. Mc Lean, investigando sustancias coagulantes procedentes de diversos tejidos, encontró accidentalmente una sustancia que retardaba considerablemente la coagulación, tanto *in vitro* como *in vivo* en inyección intravenosa en solución 1:100000. En 1918, Howel y Holt consiguieron extraer este agente, al que dieron el nombre de heparina, por ser en el hígado donde más abundantemente la encontraron, en un inicio fue extraída precisamente del hígado de perros (12).

La heparina se encuentra en la mayoría de los tejidos del organismo humano, existiendo en concentraciones elevadas en el hígado y pulmones. Se encuentra almacenada en las granulaciones basófilas de las células cebadas de Erlich o mastocitos (13).

1.4.1.1 Química

La heparina es un polímero macromolecular (mucopolisacaridos) de cadena recta, por lo que no posee un PM fijo (alrededor de 15000), consta de una secuencia de

unidades de glucosamina sulfatada y ácido D-glucorónico, unidos por enlaces glucosídicos (14). (Figura 3)

A pH fisiológico, la heparina es un compuesto aniónico (ácido), con cargas eléctricas altamente negativas en los grupos carboxílicos y sulfatos, lo que les permite unirse en forma inespecífica a las proteínas plasmáticas y a numerosos compuestos biológicos como la protamina, azul de toluidina, hexadimetrina, etc., que son capaces de antagonizar a la heparina, ocasionando la pérdida de la actividad anticoagulante. El poder anticoagulante de la heparina va a depender de los átomos de azufre presentes en su molécula, a mayor número de átomos de azufre mayor poder anticoagulante (13).

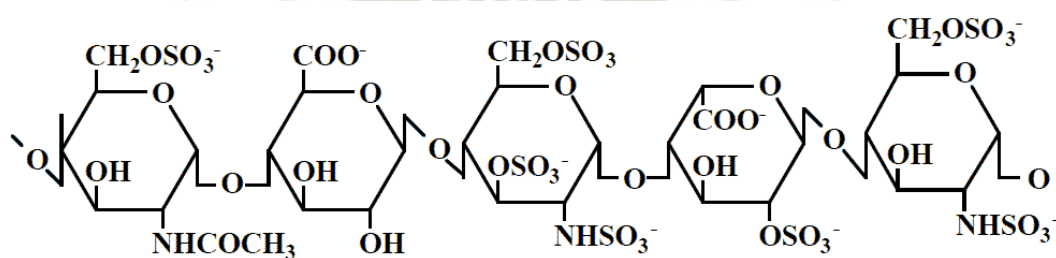


FIGURA N° 3: Estructura de la Heparina

1.4.1.2 Distribución

Se encuentra en grandes cantidades en el hígado, los pulmones y la mucosa intestinal. Para preparaciones comerciales se extrae del tejido pulmonar bovino y de la mucosa intestinal de los cerdos (recordemos que en estos tejidos se ubican en los mastocitos junto con la histamina) (15).

1.4.1.3 Clases de heparina:

Bajo el nombre común de heparinas se incluyen tres tipos de compuestos.

- Heparina estándar o clásica (HNF) (13) (15).
- Heparinas de bajo peso molecular (HBPM): obtenidas mediante despolimerización química o enzimática de la heparina estándar. Su peso molecular oscila entre 2500 a 7000 daltons. Las principales HBPM conocidas son: (13).

Enoxiparina (Clexane®): PM: 3500-5500 (13) (14).

Tedelparina = Dalteparina sódica (Fragmin): PM: 4000-6000 (13) (15).

Nadroparina (Flaxiparine®): PM:4000-5000 (13).

- Heparinoides (Hemeran): son polisacáridos sulfatados de diversa estructura química. Algunos son semisintéticos, otros se extraen de tejidos animales y poseen acción antitrombótica relacionada con el mecanismo de acción de las HNF y HBPM (13).

1.4.1.4 Mecanismo de acción:

La heparina es un anticoagulante que interfiere con las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación. No disuelve los coágulos previamente formados, sino que previene su formación y extensión. La heparina activa a la antitrombina III (anticoagulante natural que se encuentra en nuestro organismo), que limita la formación de coágulos al inactivar a la trombina y al factor X. También inhibe la agregación plaquetaria, posiblemente como consecuencia de la inhibición de la trombina. Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM: son fragmentos de heparina) tienen actividad muy similar a esta. Así la heparina forma complejos con la antitrombina, y sinergiza con ella aumentando su velocidad de inactivación de factores de coagulación (16).

La antitrombina inactiva factores activados por bloqueo irreversible de su centro activo. La principal diferencia entre la heparina estándar y la HBPM es su comportamiento frente al factor II (trombina) y el Xa, así para el bloqueo del factor II activado (trombina) se requiere que la heparina entre en contacto con el factor y la antitrombina al mismo tiempo (en este caso se requiere heparina clásica ya que es más grande), en cambio, para inactivar al factor X activado es suficiente que la heparina entre en contacto con la antitrombina III, razón por la cual para activar este factor se requiere solo HBPM (16).

1.4.1.5 Farmacocinética

La heparina se ioniza en gran medida y su tamaño molecular impide que la mucosa gastrointestinal y sublingual la absorba con facilidad, por lo que es necesario administrarla por vía parenteral. Produce efecto anticoagulante pocos minutos después de una sola aplicación intravenosa. Las heparinas de bajo peso molecular HBPM presentan diferencias farmacocinéticas sustanciales con respecto a la heparina clásica HNF: mejor absorción desde el tejido celular subcutáneo (con una biodisponibilidad del 87 al 98%), eliminación renal más lenta, con independencia de la dosis administrada (mecanismo no

saturable) y menor unión a células endoteliales, todo lo cual determina que su semivida sea casi el doble de la correspondiente a la HNF, lo que permite administrarlas en dosis única diaria (14).

Vía de administración: La heparina puede ser administrada por vía intravenosa o subcutánea profunda (SC). La vía intramuscular debe evitarse por el riesgo de formación de hematomas (12).

1.4.1.6 Indicaciones

La heparina se usa en el tratamiento de la trombosis venosa profunda y de embolia pulmonar, así como en la profilaxis contra las trombosis venosas profundas postoperatorias (toda cirugía que dura más de 30 minutos, o que implique un reposo postoperatorio en cama mayor de 5 días se considera de riesgo trombótico venoso. Algunos tipos de cirugía, como las ortopédicas, o ciertos tipos de paciente como los obesos, cancerosos e inmovilizados también se consideran de alto riesgo. La movilización precoz o los métodos físicos con medias elásticas en las extremidades inferiores son recursos con las que el cirujano trata de disminuir estos riesgos. En la actualidad se utilizan profilácticamente las heparinas, desde 2 horas antes de la cirugía, ya sea la heparina estándar en dosis bajas o las HBPM) y del embolismo pulmonar en pacientes de alto riesgo; en el infarto de miocardio (17).

1.4.1.7 Contraindicaciones

La heparina no debe ser administrada en pacientes que tienen hemofilia, trombocitopenia, tuberculosis activa, amenaza de aborto, hemorragia intracraneal o úlceras pépticas.

1.4.1.8 RAMS:

La heparina produce una serie de efectos secundarios, que consiste en la aparición de hemorragias (que se tratan interrumpiendo el tratamiento o administrando un antagonista de la heparina como es el sulfato de protamina, que es un compuesto cargado positivamente), necrosis cutánea, trombocitopenia y reacciones de hipersensibilidad. Su uso prolongado puede provocar osteoporosis (si su uso es de más de tres meses) y alopecia.

1.4.2. Warfarina

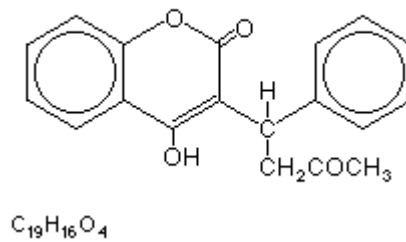


FIGURA N° 4: Estructura de la Warfarina

1.4.2.1 Mecanismo de Acción

Los ACO son eficaces solamente *in vivo*. Los ACO son anticoagulantes que no actúan directamente sobre el complejo mecanismo de la coagulación, lo hacen en forma indirecta pues interfieren con la vitamina K, que como vimos es muy necesaria para la síntesis por parte del hígado de ciertos factores de la coagulación (II, VII, IX y X; conocidos como factores K-dependientes) y de las proteínas anticoagulantes C y S. En términos generales, los ACO son antagonistas de la vitamina K, que compiten con ella con el mecanismo de activación hepática de los factores de la coagulación, impidiendo así la síntesis de factores activos (18).

Los ACO son antagonistas de la vitamina K impidiendo que la vitamina K participe en la gamma-carboxilación de los factores de la coagulación que dependen de la vitamina K (K-dependientes). El bloqueo de la gamma carboxilación origina que los factores K-dependientes se hallen en la sangre en cantidades normales, pero carentes de actividad coagulante (18).

1.4.2.2 Indicaciones

La warfarina y los fármacos relacionados se utilizan en pacientes con embolia pulmonar o trombosis venosa profunda o para impedir la trombosis en pacientes con válvulas cardíacas artificiales o que deban permanecer inmobilizados durante periodos prolongados. La warfarina se utiliza también en pacientes sometidos a cirugía ortopédica (13).

Los ACO a diferencia de la heparina no tienen actividad inmediata pues para que se noten los efectos clínicos, tiene que metabolizarse los factores que aún están en la sangre.

Debido a esta demora en su actuar de los ACO, la anticoagulación suele empezar con heparina. Luego se administran los cumarínicos para mantener el efecto. Al aumentar el efecto coagulante del cumarínico, se puede reducir gradualmente la dosis de heparina. Una vez conseguido el grado deseado se debe continuar con el ACO durante 3 a 6 meses o más en pacientes ambulatorios (13).

1.4.2.3 Farmacocinética

Las cumarinas se absorben bien en el intestino delgado, se une a las proteínas plasmáticas (especialmente la albúmina), pasan a la leche materna, y se excretan principalmente por vía renal (19).

Vía de administración: Los ACO se administran solo por vía oral (VO); la excepción es la warfarina sódica que es una sal muy estable que también se puede administrar por vía parenteral (19).

1.4.2.4 Contraindicaciones

No están indicados inicialmente los antagonistas de la vitamina K en los pacientes que sufren una trombosis cerebral o una oclusión de una arteria periférica y están contraindicados en caso de úlcera péptica o hipertensión, así como en mujeres gestantes (20).

1.4.2.5 RAMS

Las hemorragias constituyen un efecto colateral de primer grado de los antagonistas de la vitamina K (20).

1.4.2.6 Interacciones Medicamentosas

El ácido acetil salicílico incrementa los efectos de las cumarinas, incrementando por lo tanto el riesgo de hemorragias (14).

El cotrimoxazol y la cimetidina también incrementan el riesgo de hemorragias cuando se administran junto con la warfarina (14).

1.4.3. Agentes Descalcificantes

Los iones calcio (factor IV) se encuentran en el cuerpo entero y participan en casi todas las etapas del proceso hemostático, por lo tanto, la eliminación de Ca^{2+} impiden que la sangre se coagule *in vitro* (19).

Los agentes descalcificantes son anticoagulantes *in vitro*, en efecto el método más corriente para conseguir *in vitro* que la sangre sea incoagulable (no se coagule) consiste

en eliminar los iones calcio, que como vimos son necesarios para la coagulación, lo que se obtiene con el agregado de oxalatos y citratos, los citratos por su parte se obtienen de frutas cítricas (19).

1.4.4.Mecanismo de Acción

Algunos factores de la coagulación (como el factor VII) requieren iones Ca^+ y fosfolípidos para lograr su actividad proteolítica. Los iones calcio logran la adherencia del factor de la coagulación a los fosfolípidos de membrana (ubicados y proporcionados por las plaquetas), por lo que el calcio se comporta como un cofactor enzimático. Los agentes descalcificantes (EDTA y citratos) contienen grupos COO^- que quelan o atrapan a los iones calcio. Los oxalatos más bien precipitan al calcio en oxalato de calcio, una sal insoluble. El efecto es reversible ya que con la adición de iones Ca^{2+} el proceso se revierte. En términos sencillos los agentes descalcificantes previenen la actividad enzimática de los factores de la coagulación calcio dependientes (15).

El citrato de sodio añadido a la sangre, a la concentración de 0,2 a 1%, la mantiene incoagulable, lo que se aprovecha especialmente para realizar la transfusión sanguínea. Esta acción anticoagulante in vitro se debe a que se forma un complejo, calciocitrato de sodio, en que el calcio no está ionizado. Además, el citrato se combina con la protrombina y forma un complejo. De manera que esta sustancia (el citrato de sodio) actúa también como antiprotrombina (15).

1.4.4.1 Farmacocinética

El citrato de sodio por vía EV no posee acción anticoagulante in vivo, pues para que ello fuera posible debería producirse una hipocalcemia incompatible con la vida. Justamente los síntomas de hipocalcemia constituyen el cuadro de intoxicación por el citrato de sodio y pueden observarse en el curso de transfusiones masivas de sangre. El citrato de sodio se absorbe bien por vía oral, se metaboliza completamente en el organismo de manera que no aparece en la orina como tal, a menos que se ingieran grandes cantidades de esta sal. Por esta última acción es que se le utiliza como alcalinizante de acción sistémica, elevando el pH de la orina –alcalinización urinaria-. Esto se debe a la metabolización del citrato que deja libre el catión sodio, el cual se une al anión bicarbonato disponible (21).

1.4.4.2 Indicaciones

El citrato de sodio se usa principalmente como anticoagulante in vitro para la transfusión de sangre. También se emplea para la alcalinización de la orina, con las mismas indicaciones que el bicarbonato de sodio infecciones urinarias, litiasis úrica y cuando se administran uricosúricos, pero sin trastornar la fisiología gástrica, en la dosis usual (22).

1.4.4.3 Toxicidad

Los cuadros de toxicidad graves por citrato de sodio son raros, generalmente se presentan fenómenos tóxicos cuando se administra por vía EV, como sucede en el caso de la transfusión sanguínea realizada en forma masiva y rápidamente. Los trastornos se deben a la hipocalcemia (23).

1.5. FÁRMACOS TROMBOLÍTICOS

1.5.1. Acción general de los agentes trombolíticos:

Todos los trombolíticos se comportan como activadores del plasminógeno; es decir, sustancias que estimulan la conversión del plasminógeno (proenzima) en plasmina (enzima). Como se sabe, la plasmina (que está presente en nuestro organismo) es la enzima encargada en degradar a la fibrina, provocando la disolución del coágulo y la formación de productos de degradación: (24).

Según su mecanismo de acción, los trombolíticos pueden dividirse teóricamente dos grupos: (25).

Los activadores “no fibrinoespecíficos” como la estreptoquinasa (SK), la uroquinasa (UK) y la anistreplasa (APSAC), convierten tanto al plasminógeno circulante como al unido al coágulo en plasmina, dando lugar no solo a la lisis de la fibrina en el coágulo, sino también a una importante fibrinogenólisis (degradación del fibrinógeno circulante) sistémica, fibrinogenemia (disminución del nivel de fibrinógeno sanguíneo) y elevación de los productos circulantes de la degradación de fibrina (13).

Los activadores “fibrinoespecíficos” en virtud a su relativa selectividad por el complejo plasminógeno-fibrina, dan lugar, fundamentalmente, a la lisis de fibrina en la

superficie del coágulo, sin afectar teóricamente al fibrinógeno circulante; entre ellos: activador tisular del plasminógeno (t-PA) o alteplasa (15).

1.5.2.Farmacocinética General

No se absorben por vía oral. La SK se administra por vía endovenosa (EV) llegando al torrente sanguíneo directamente a su sitio de acción. El fármaco atraviesa muy poco la barrera placentaria, pero sus anticuerpos específicos si, por lo que debe evitarse su uso durante las primeras 18 semanas de gestación. La mayor parte de la SK es degradada y excretada por el riñón. El metabolismo de la UK no está bien estudiado en el hombre, pero parece que la mayor parte se metaboliza en el hígado y una proporción pequeña es eliminada por la orina en forma activa (15).

1.5.3.Indicaciones de los Agentes Trombolíticos:

Principalmente en infarto agudo de miocardio, además en el tratamiento de tromboembolismos pulmonares, trombosis arteriales y venosas periféricas, trombosis cerebral o en la resolución de la trombosis de la vena central de la retina (23).

1.5.4.RAMS de los Agentes Trombolíticos

Fundamentalmente hay que considerar las complicaciones hemorrágicas (la causa principal es la lisis de la fibrina del trombo en los lugares de daño vascular, por lo que las hemorragias son más frecuentes en aquellos lugares en los que se ha producido procedimientos invasivos previos. También son debidas al estado lítico sistémico que se produce como resultado de la formación sistémica de plasmina, así como de la destrucción de otros factores de la coagulación, de la disminución de fibrinógeno y la generación de productos de degradación del fibrinógeno con acción anticoagulante. Las hemorragias suelen ser internas: sangrado gastrointestinal, del tracto genitourinario, intracraneal o superficial donde se ha realizado cirugía reciente). Independientemente del trombolítico, en el punto de punción intravenosa aparece un hematoma en el 99% de los casos (15).

La estreptoquinasa puede producir también reacciones alérgicas, a veces relacionadas con infecciones alérgicas estreptocócicas previas, evidenciándose desde

reacciones cutáneas hasta broncoconstricción. Solo con la administración rápida de estreptocinasa se puede producir intensa hipotensión (23).

1.5.5. Contraindicaciones de los trombolíticos:

Hemorragia activa, intervención quirúrgica en los 10 días previos, incluso biopsia de órganos, traumatismo grave, hemorragia gastrointestinal profusa en los tres meses previos, trastorno hemorrágico, hipertensión (provoca hipotensión grave, presión sistólica > 110 mm Hg), embarazo, mayores de 75 años, TBC cavitaria reciente (13).

1.5.6. Estreptocinasa

Químicamente es una proteína no enzimática, obtenida principalmente de cultivos de estreptococo beta-hemolítico. Es el agente más utilizado debido a su fácil obtención y bajo costo (15).

Debido a su origen bacteriano la SK es inmunogénica y desencadena la producción de anticuerpos anti-SK; de este modo, tras su administración EV, la estreptocinasa es neutralizada inicialmente por los anticuerpos de la sangre, y su efecto fibrinolítico recién comienza cuando la cantidad administrada supera la acción de estos anticuerpos, en tanto que la trombólisis se inicia cuando el medicamento alcanza el trombo (23).

La SK tiene un mecanismo de acción indirecto (no posee actividad enzimática por sí misma sobre la fibrina), pues activa indirectamente el sistema fibrinolítico, uniéndose al plasminógeno uno a uno, formando un complejo activador SK-plasminógeno que provoca un cambio conformacional que permitirá su conversión en plasmina. La estreptocinasa o estreptoquinasa no sólo inactiva al plasminógeno unido a la fibrina sino también el soluble en plasma, lo que origina un estado de hiperplasminemia. La SK genera 10 veces más plasmina in vivo que la urocinasa (o uroquinasa) (15).

1.5.7. Urocinasa (Uk)

Es un activador endógeno y “no fibrinoespecífico” del plasminógeno aislado inicialmente de la orina humana (de allí su nombre). Ahora se obtiene de diferentes tejidos, como endotelio, células embrionarias renales, varios tumores y recientemente mediante ingeniería genética. La UK a diferencia de la SK no es inmunogénica, por lo que su

administración no produce anticuerpos neutralizantes ni reacciones de hipersensibilidad. Esto supone que el tratamiento puede ser repetido en cortos periodos de tiempo (13).

La UK estimula el paso de plasminógeno a plasmina directamente, ejerciendo su acción hidrolítica sobre el plasminógeno sin necesidad de que exista fibrina (13).

Al igual que la SK, la UK es un activador “no fibrinoespecífico” por lo que provoca un estado lítico sistémico. La administración de UK produce una rápida disminución de la concentración plasmática de plasminógeno y de forma paralela aumentan los niveles circulantes de plasmina. En concentraciones elevadas, además de la fibrinólisis, puede producir alteraciones de la coagulación al reducir los niveles plasmáticos de fibrinógeno y de los factores V y VII de la coagulación y provoca la formación de productos de degradación del fibrinógeno (13).



CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE REALIZACIÓN

La investigación teórica del problema de investigación experimental se llevó a cabo en la biblioteca de la Universidad Católica de Santa María, la obtención del extracto, así como el análisis fitoquímico se desarrolló en el Laboratorio de Farmacognosia, la actividad anticoagulante y fibrinolítica se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Clínico de la misma universidad.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Materiales y equipos de laboratorio

2.2.1.1 Utilaje de laboratorio

- Varillas agitadoras.
- Vasos de precipitados 100 mL (PIREX).
- Matraces Erlenmeyer de 100 mL (PIREX).

- Tubos de ensayo (PIREX).
- Pipetas de 1mL, 5mL, 10mL (PIREX).
- Probetas de 50 y 100 mL (PIREX).
- Láminas de porcelana con excavaciones.

2.2.1.2 Equipos de laboratorio

- Equipo rotavapor (BUCHI).
- Equipo de destilación Soxhlet 250 mL (EURO LAB).
- Percolador 250 mL (PIREX).
- Frigorífico (SAMSUNG).
- Centrífuga analítica (GEMMY).
- Balanza analítica (PIONER TM OHAUS).
- Lámpara de luz UV (CAMAG UV 254 – 366nm).
- Estufa de desecación (MEMMERT SCHUTZART DIN 40050 – IP20).

2.2.1.3 Reactivos

- Acetato de etilo (MALLINCKRODT) 99.6 – 100%.
- Ácido acético (MERCK).
- Ácido fórmico (MERCK) 98 – 100%.
- Ácido sulfúrico (MERCK) 95 – 97%.
- Agua destilada (QUÍMICA DELTA).
- Alcohol etílico (QUÍMICA DELTA).
- Cloruro de aluminio (MERCK) 97 – 100%.
- Cloruro férrico (MERCK).
- Metanol Q.P. (MERCK).
- Reactivo de Dragendorff (Elaboración U.C.S.M).

- Reactivo de Liebermann Burchard (Elaboración U.C.S.M).
- Vainillina.
- Tween 80 (MERCK).

2.2.1.4 Otros materiales

- Frascos de vidrio.
- Gorro de laboratorio (Laboratorio CEMEDIC SAC).
- Guardapolvo.
- Guantes de examen (Laboratorio CEMEDIC SAC).
- Láminas de silica gel (TLC PLATE MERCK).
- Mascarilla (Laboratorio CEMEDIC SAC).
- Jeringas hipodérmicas.
- Algodón hidrófilo (Laboratorio STERILAB).
- Alcohol iodado.
- Manguerilla de látex.
- Mortero de porcelana.
- Soporte universal.
- Cocinilla eléctrica.
- Espátulas de acero.
- Olla metálica.

2.2.2. Materiales biológicos

- Especímenes frescos de piña o *Ananas sativus*.
- Sangre humana obtenida mediante punción venosa.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Metodología de investigación científica

2.3.1.1 Tipo de estudio

Investigación experimental.

2.3.1.2 Diseño de estudio

Es de post tratamiento y grupo control, con aleatorización de la muestra de estudio.

2.3.1.3 Población

Sangre humana

2.3.1.4 Muestra

La muestra estuvo conformada por sangre humana proveniente de 12 sujetos diferentes, los que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión.

- Mayores de edad: sujetos en edad de 18 a 25 años
- Sexo masculino
- Sujetos sanos
- Sujetos que no hayan tenido intervención quirúrgica durante el presente año.
- No haberse administrado 15 días antes de la extracción de sangre, fármacos anticoagulantes, fibrinolíticos, antiagregantes plaquetarios y AINEs.

2.3.1.5 Plan de muestreo

El plan de muestreo del presente estudio fue no probabilístico, en atención al criterio de la investigadora y el cumplimiento de los criterios de inclusión.

2.3.1.6 Asignación aleatoria de la muestra

La muestra fue asignada en forma aleatoria, es decir, al azar para cada tratamiento.

2.3.2. Métodos de Farmacognosia

2.3.2.1 Recolección

Los especímenes de *Ananas sativus* o piña fueron recolectados en la localidad de Huetupe uno de los distritos de la Provincia de Manu Departamento de Madre de Dios, la misma que se ubica a una Altitud de 447 msnm Latitud: -12.9939 Longitud: -70.5272.

Se recolectaron especímenes de *Ananas sativus* o piña que crecen mediante cultivo, en la zona denominada Barranco Chico, de propiedad privada, para su recolección se eligió frutos inmaduros junto a su tallo (Figura 5).



FIGURA N° 5: Recolección de *Ananas Sativus* (piña)

2.3.2.2 Selección

Se seleccionaron los tallos de *Ananas sativus* o piña en buen estado prescindiéndose del fruto (Figura 6).



FIGURA N° 6: Tallo de *Ananas Sativus* (piña)

2.3.2.3 Estabilización

Debido al carácter semileñoso de la droga de *Ananas sativus* o piña para su estabilización fue necesario cortar en secciones del tallo de cinco a seis centímetros de espesor, con la ayuda de una sierra de diente pequeño. Las secciones del tallo de *Ananas sativus* o piña aprovechando que son fibrosas fueron vueltas a cortar en pequeños trozos largos. Para finalmente ser introducidos a una estufa calentada previamente a 105°C y sometidas a esta temperatura durante 3 minutos.

2.3.2.4 Dsecación

La desecación posterior a la estabilización también se realizó en estufa, pero a una temperatura de 50°C, durante 1 día.

2.3.2.5 Trituración

La trituración de los tallos de *Ananas sativus* o piña, se realizó mediante molino de cizallas habilitando una licuadora obteniendo un polvo semifino en cuanto al tamaño de partícula (Figura 7).

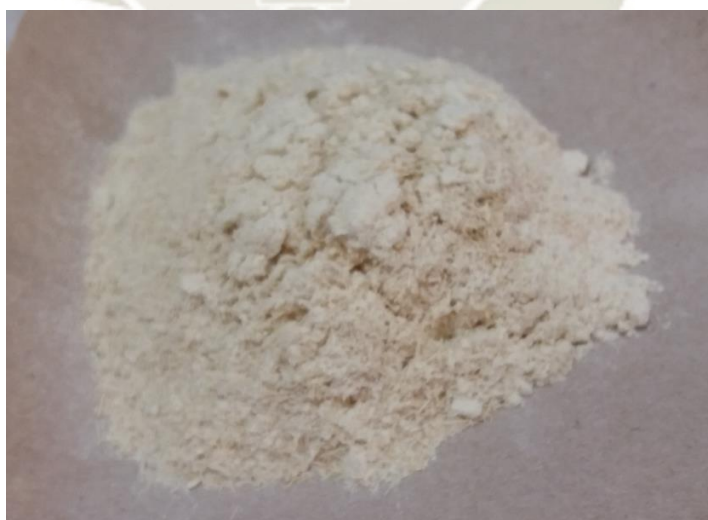


FIGURA N° 7: Muestra triturada del tallo de *Ananas Sativus* (piña)

2.3.2.6 Extracción

2.3.2.6.1 Método Soxhlet

La extracción sólido-líquido, se usa a menudo para extraer un producto natural a partir de su fuente natural, tal como una planta. Se escoge un solvente que selectivamente disuelva el compuesto deseado pero que deje los sólidos insolubles indeseados en la fuente natural. Un aparato de extracción continua sólido-líquido, llamado extractor Soxhlet, se usa muy comúnmente en un laboratorio de investigación de productos naturales (26).

El sólido que se va a extraer se coloca en un dedal hecho de papel filtro, y el dedal se inserta en el centro de la cámara. Un solvente de bajo punto de ebullición, por ejemplo, éter dietílico o alcohol etílico, se coloca en el balón de destilación de fondo redondo y se calienta hasta reflujo. Los vapores suben por el lado izquierdo hacia el condensador donde se condensan. El líquido condensado cae dentro del dedal que contiene el sólido. El solvente caliente empieza a llenar el dedal y extrae el compuesto deseado a partir del material vegetal. Una vez que se llena con solvente, el cual contiene el compuesto deseado disuelto, se regresa dentro del balón de destilación. El ciclo vaporización-condensación-extracción-evacuación por el sifón, se repite varias veces, y el producto deseado se concentra en el balón de destilación (26).

Procedimiento

Se realizaron tres extracciones, para ello se tomó 12 gramos de tallo de *Ananas sativus* o piña triturado y se empaquetó en papel filtro. Luego fueron colocados al tubo de extracción del equipo y se procedió a la extracción hasta agotamiento de la droga. Para ello se utilizó 150 ml de alcohol etílico de 96° como menstruo (Figura 8).

Una vez terminada la extracción en soxhlet se procedió a la evaporación del solvente en Baño María (hasta mantener peso constante), una vez obtenido los datos se realizó el cálculo del porcentaje de rendimiento del extracto.

$$\% RE = \frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Peso planta seca}} \times 100$$



FIGURA N° 8: Extracción mediante soxhlet del tallo de *Ananas Sativus* (piña)

2.3.2.6.2 Método Percolación

La percolación tiene por objeto la extracción de la mayor parte de los principios solubles contenidos en las drogas animales o vegetales (27).

Consiste, esencialmente, en un recipiente cilíndrico o ligeramente cónico, con o sin tapón de cristal y que en el extremo inferior deja salir el líquido, bien sea por una llave de cristal que tiene en su estrangulamiento o bien colocando en la parte inferior del tubo un tapón de goma o de corcho, agujereado y por cuyo agujero pasa un pequeño tubo de cristal que no sobrepasa el tapón y al cual se empalma otro tubo de goma. Entre ambos tubos se intercala una llave de paso para regular la caída del contenido (27).

También se utiliza en esta operación una placa filtrante adosada del recipiente, así como una varilla, preferentemente de cristal, con la cual se agita y apelmaza el polvo contenido en el aparato, siendo conveniente para ello que tenga una base de aplastamiento en el extremo inferior (27).

Procedimiento

Se realizó tres extracciones, para ello se trabajó con 20.48 gramos aproximadamente de tallo de *Ananas sativus* o piña triturado, los que fueron colocados en el percolador, luego se procedió a la percolación por goteo (20 gotas por minuto) hasta

agotamiento de la droga. Para ello se utilizó 400 mL de alcohol etílico de 70° como menstruo (Figura 9).

Una vez terminada la extracción por percolación, se procedió a la evaporación del solvente en Baño María (hasta mantener peso constante), una vez obtenido los datos se procedió al cálculo del porcentaje de rendimiento del extracto.

$$\% RE = \frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Peso planta seca}} \times 100$$



FIGURA N° 9: Extracción mediante Percolación de tallo de *Ananas Sativus* (piña)

2.3.3. Métodos de Fitoquímica

2.3.3.1 Método de cromatografía en capa fina

El principio fundamental de la cromatografía en capa fina ya fue establecido por Ismailow y Schraiber (1938), la cromatografía de capa fina es una forma de absorción sólido líquido. Donde se emplea una placa de vidrio o una lámina metálica, que se cubre con una película de unos 250 μm de espesor de un adsorbente (gel de sílice u óxido de aluminio, entre otros). (28) Esta separación se lleva a cabo en una cubeta que contiene un agente eluyente hasta una altura de 0.5 cm; las sustancias que se separan se detectan posteriormente de forma apropiada. Por variación y preparación adecuada de la capa de adsorción se consigue el análisis de mezclas de sustancias tanto hidrófilas como lipófilas (28).

Procedimiento

Se utilizaron placas de silica gel con dimensiones de 3x10cm, las cuales se enmarcaron suavemente con un lápiz para no dañar el adsorbente en línea recta a 1cm del borde inferior de la placa, se procedió a elaborar los capilares con ayuda de un mechero y se eligió el eluyente adecuado para la fase móvil.

Seguidamente se aplicó la muestra con un capilar limpio tocando ligeramente la placa, una vez sembrada la placa se preparó la cuba cromatografica con el eluyente adecuado, se introdujo la placa a la cuba cromatografica se tapó y se dejó que corra la muestra hasta 1-2cm del borde superior de la placa, se procedió a retirar la placa con cuidado y se dejó secar a temperatura ambiente, luego se roció con el revelador respectivo y se dejó secar. Ya lista la placa se llevó a la lámpara UV donde se observa las fluorescencias para cada identificación de metabolitos secundarios

Fases Móviles

Las fases móviles estuvieron constituidas por mezclas de disolventes, el tipo de disolvente y sus proporciones según la reacción de identificación se recogen en la (Tabla 1).

Tabla N° 1: Fases móviles para la Cromatografía en capa fina

	Acetato de etilo	Ácido acético	Ácido fórmico	Agua	Metanol	Tolueno
General	97			10	20	
Terpenos	5					95
Flavonoides	100	11	11			26
Taninos				30	70	
Alcaloides		70		20	10	

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Revelador General: Reactivo vainillina – ácido sulfúrico

Para la solución A se mezcló vainillina 1g con etanol c.s.p. 100mL

Para la solución B se mezcló ácido sulfúrico concentrado 5mL con etanol c.s.p. 100mL.

Una vez preparadas las soluciones se pulverizo la placa con la solución A, se dejó secar y luego se pulverizo con la solución B, después se sometió la placa a 110°C por 10 minutos.

Revelador para Terpenos: Reactivo de Liebermann Burchard

Se mezcló 5 mL de ácido acético y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla se agregó con cuidado y enfriando a 50 mL de etanol. Previamente pulverizada la placa fue calentada a 110°C por 10 minutos.

Revelador para flavonoides: Reactivo de cloruro de aluminio

Se mezcló cloruro de aluminio 1g con etanol c.s.p. 100mL

Se pulverizo la placa con la solución preparada.

Seguidamente se observó a luz UV-254nm.

Revelador para taninos: Reactivo de cloruro férrico

Para el reactivo se mezcló cloruro férrico 1g con etanol c.s.p. 100mL

Se pulverizo la placa con la solución recientemente preparada y dejar secar, después se sometió la placa a 110°C durante 10 minutos.

Seguidamente se observó a luz UV-254nm.

Revelador para alcaloides: Reactivo de Dragendorff

Para la solución A se disolvió 0.85g de nitrato básico de bismuto en 10mL de ácido acético y 40mL de agua tibia.

Para la solución B se disolvió 8 g de yoduro de potasio en 30mL de agua destilada.

Para la solución stock se mezcló la solución A y la solución B (1:1), en el spray se mezcló 1mL de la solución stock con 2mL de ácido acético y 10mL de agua tibia.

El reactivo recientemente preparado se aplicó sobre la placa pulverizándola y luego se dejó secar.

2.3.4. Métodos de Análisis Clínicos

2.3.4.1 Obtención de las muestras de sangre

La sangre humana se obtuvo mediante el método de punción venosa y punción cutánea.

2.3.4.1.1 Punción venosa

Mediante el método de punción venosa en el cual se escogió una vena del pliegue del codo, con el brazo del paciente en extensión. Para ello se aplicó un torniquete al brazo, por encima del sitio donde se va a puncionar, para provocar distensión venosa, pero este debe mantenerse el menor tiempo posible, para evitar modificaciones importantes en los valores de algunos parámetros (29).

La piel del sitio escogido para la punción fue limpiada con etanol al 70 % y se dejó secar. Se debe evitar palpar de nuevo con el dedo.

La aguja se hizo penetrar en la vena con el bisel hacia arriba y en un ángulo próximo a los 45° (Figura 10). El torniquete fue retirado tan pronto penetro sangre al interior de la jeringa. Al terminar la extracción, se retiró la aguja y se colocó una torunda de algodón o gasa en el sitio de la punción. Luego se procedió a depositar con cuidado la sangre en los tubos correspondientes (29).



FIGURA N° 10: Extracción de sangre venosa

2.3.4.1.2. Punción cutánea

Para la punción cutánea se ubicó en el extremo del dedo que posee menor sensibilidad, el sitio escogido se limpió usando un pedazo de algodón humedecido en etanol 70°, después se pasó un pedazo de algodón seco para retirar los residuos de etanol. Luego se procedió a Punzar el dedo con la lanceta estéril lo suficientemente profunda y rápida para que la sangre fluya de manera espontánea, la primera gota de sangre se limpió con un pedazo de algodón seco y se oprimió ligeramente el dedo para extraer la sangre (30).

2.3.4.2 Diluciones de los extractos para la evaluación

Tanto el extracto seco obtenido por Percolación y el obtenido mediante destilador Soxhlet, fueron sometidos a dilución, a varias concentraciones decrecientes, como el producto era un extracto seco en primer lugar para el extracto obtenido por soxhlet se preparó un medio disolvente consistente en una solución acuosa de Tween 80 al 5%, esta solución se preparó 5 g con 100 mL de agua destilada. En cambio, para el extracto obtenido por percolación solo se utilizó agua destilada para su disolución.

Luego se disolvió 2 gramos de extracto seco de tallo de *Ananas sativus* o piña, posteriormente se le añadió la solución disolvente preparada hasta 10 mL, de este modo obtendremos una solución al 20%.

En la tabla 2 se muestra las diluciones elaboradas, para la evaluación se trabajó con tres de estas diluciones, con la finalidad de tomar tramos o rangos distantes, ya que como se trató de un extracto vegetal es muy probable que no haya diferencia significativa con rangos cortos. La parte sombreada de la tabla 2 indica las concentraciones elegidas, que fueron las extremas y la intermedia.

Tabla N° 2: Dilución del extracto de piña a distintas concentraciones

Descripción	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
Volumen de Sol. Madre 20%extracto (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4
Suero fisiológico estéril	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Volumen final	1	1	1	1	1	1	1
Cc final	20	18	16	14	12	10	8

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Las concentraciones finales correspondientes al 20, 14 y 8%, fueron las que finalmente se utilizaron, tanto para la extracción mediante equipo Soxhlet y Percolación, por lo que en total fueron 6 formas extractivas a evaluar, tres concentraciones decrecientes por cada método.

2.3.4.3 Evaluación de la actividad anticoagulante

La evaluación anticoagulante fue medida mediante dos métodos.

2.3.4.3.1 Tiempo de coagulación *in vitro*

Se realizó mediante el método de Burker, para ello en una lámina de vidrio con excavaciones se colocó tres gotas de cada concentración de extracto, una gota por cada excavación. Solo en el control no se colocó ningún extracto.

Se procedió con la desinfección del área del pulpejo del dedo de cada participante con alcohol medicinal 70° (se recomendó a cada sujeto lavarse previamente las manos), y se realizó la punción con una lanceta estéril. Tener lancetas según el número de sujetos y veces a extraer sangre.

Posteriormente se colocó una gota de la muestra de sangre sin coagular en cada excavación, es decir, en total tres gotas, y se dejó en reposo tres minutos. Luego con la ayuda de un estilete o aguja hipodérmica estéril se trató de levantar cada 15 segundos la primera gota de sangre, hasta la formación de un hilo de fibrina como se muestra en la (Figura 11) que es el momento en que la sangre ha coagulado, entonces se pasa a la segunda gota y así a la tercera.

Se consideró dos tiempos a medir, con la ayuda de un cronómetro.

- Tiempo 0: es el tiempo desde que sale la gota del pulpejo del dedo.
- Tiempo Final: es el tiempo cuando la tercera gota haya coagulado.

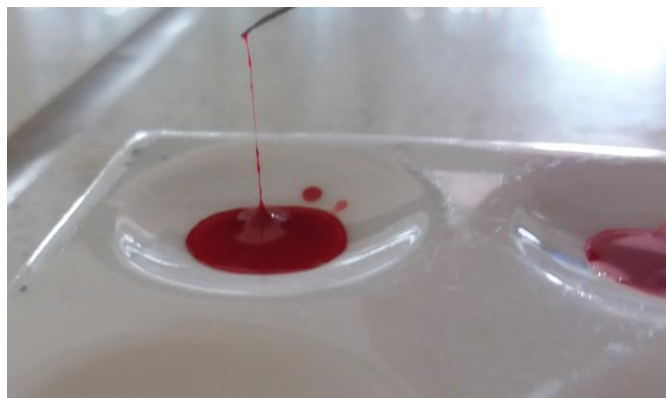


FIGURA N° 11: Formación de hilo de Fibrina

2.3.4.3.2 Tiempo de protrombina

Se utilizó la técnica establecida por Quick y Citada por Todd. Este método mide la actividad combinada del fibrinógeno, protrombina y los factores V, VII y X; por lo tanto, evalúa eficazmente la vía extrínseca de la formación del activador de protrombina. Su principio se basa en que el plasma obtenido de una sangre a la que se agregó un anticoagulante que ligue calcio (citrato sódico 3.2%) coagulará en pocos segundos si se recalifica en presencia de un preparado de Calcio-Tromboplastina. El tiempo registrado es el que media entre el agregado de calcio y la presencia del coágulo visible.

Procedimiento

De las muestras de sangre extraídas se tomó una muestra de sangre (2 mL), con una solución de citrato de sodio (3.2%), observando estrictamente las proporciones de mezcla de sangre y anticoagulante (9:1).

Inmediatamente después de la extracción de sangre, ésta se mezcló bien y se trasladó a un tubo de centrifuga, evitándose la formación de espuma. Se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, para la obtención de plasma citratado (la centrifugación puede hacerse hasta 2 horas como máximo después de la obtención de sangre). La muestra obtenida es estable 4 horas a 15-25°C.

Previamente se atempero la tromboplastina el cloruro de calcio 0.02 M a 37°C.

Posteriormente en un tubo de ensayo se colocó las diluciones de los extractos de *Ananas sativus* (pina), para ello se tomó 0.2 mL de cada dilución, etiquetando la concentración del extracto correspondiente, luego se añadió 0.2 mL de tromboplastina (4 UI/ml), 0.2 mL de plasma citratado, y 0.2 mL de cloruro de calcio al 0.02 M, en este orden.

Luego la mezcla total se agito suavemente y se colocó a incubación en baño maría durante 2 minuto a 37°C.

Se registró los tiempos de aparición del coágulo. Se consideró el tiempo 0 desde el momento de la adición del cloruro de calcio.

Se preparó un control negativo sustituyendo el extracto por el mismo volumen (0.2 mL) de suero fisiológico.

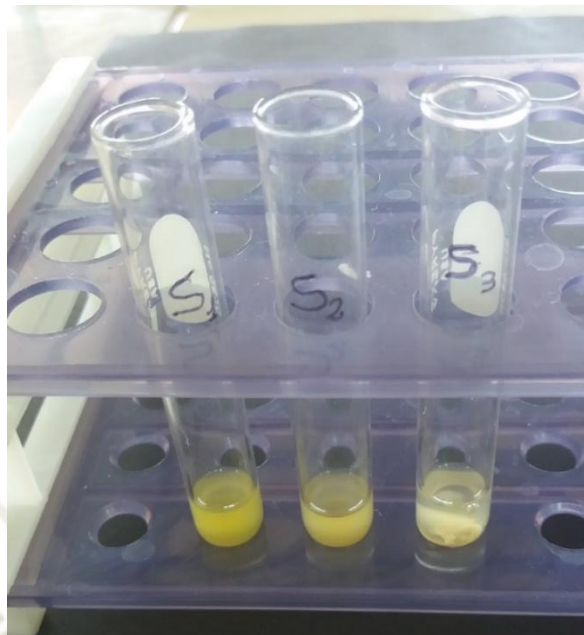


FIGURA N° 12: Formación de coagulo

2.3.4.4 Evaluación de la actividad fibrinolítica

2.3.4.4.1 Método de Prassad

Para la evaluación de actividad fibrinolítica se realizó mediante el método de Prassad para ello se identificaron y pesaron en balanza analítica previamente nueve tubos Eppendorf, por cada muestra de sangre y se anotaron sus pesos.

Se añadió a cada tubo 0.5 mL de sangre y se pre incubó a 37°C en estufa durante 45 minutos.

Formado el coágulo se retiró con cuidado todo el suero de la muestra mediante aspiración con micropipeta sin alterar el coagulo formado.

Luego de ello se volvió a pesar el tubo con balanza analítica, y por diferencia de peso se halló el peso del coágulo.

Posteriormente se añadieron 0.5 mL de las diluciones creciente de extracto de piña a los tubos con el coagulo con peso conocido, y se incubaron en estufa a 37°C durante 90 minutos, finalmente se removió el líquido de los tubos y se volvieron a pesar. (Figura 13) Para el grupo control se añadió 0.5 mL de suero fisiológico.

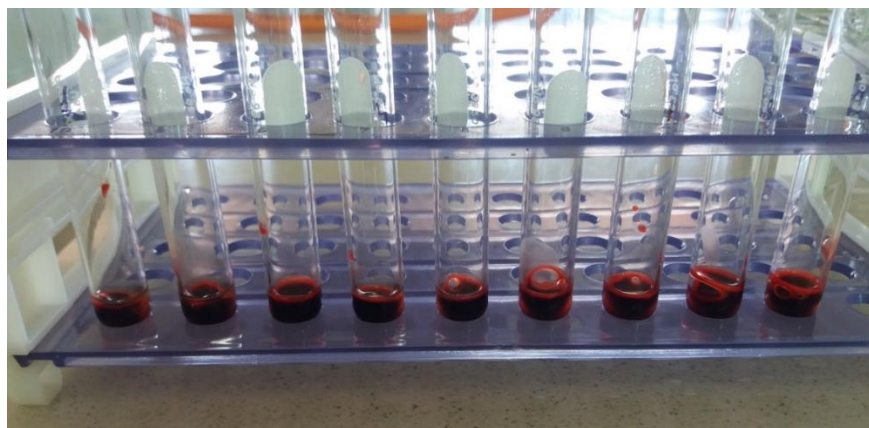
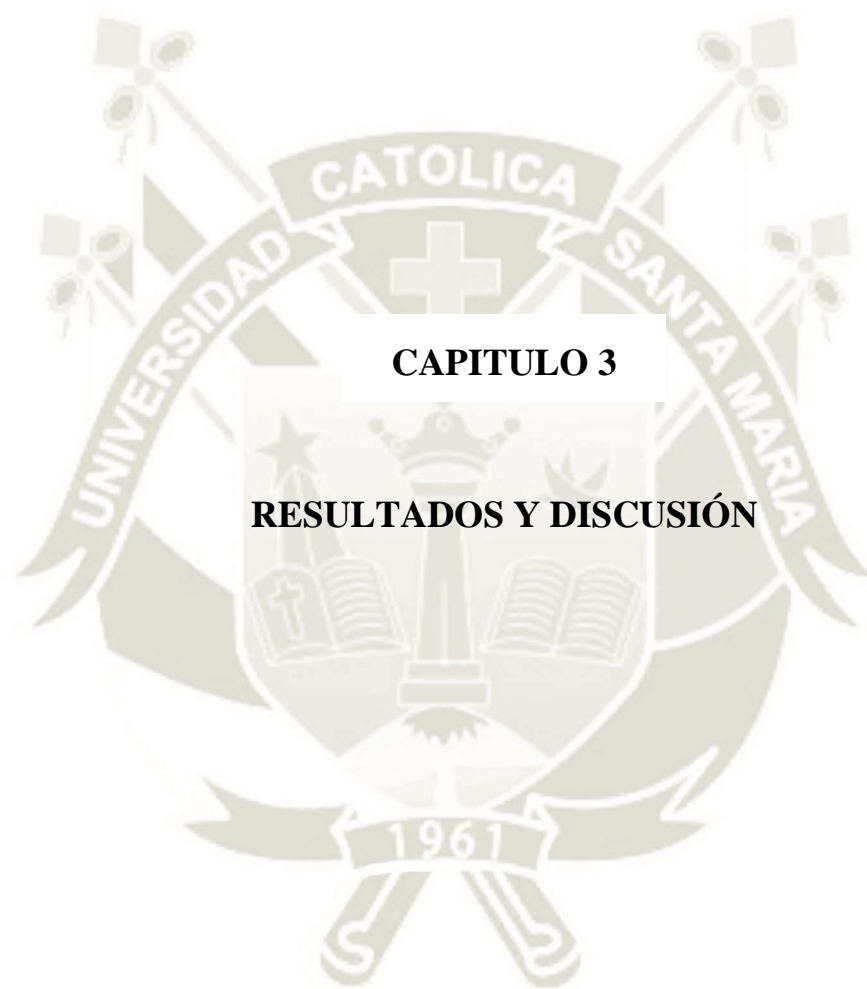


FIGURA N° 13: Actividad fibrinolítica

2.3.5. Métodos de Análisis de datos

El análisis de la información será mediante el uso de herramientas estadísticas para determinar, se utilizaron el promedio, mediana, desviación estándar, Anova y Test de Tukey. Estos últimos estadígrafos con el fin de determinar similitudes o diferencias estadísticas y comparar los distintos grupos experimentales.



CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para la evaluación de la actividad sobre el proceso de coagulación y fibrinólisis se obtuvieron dos extractos del tallo de *Ananas sativus* (piña), mediante dos métodos de obtención continuos diferentes, Soxhlet y percolación, luego de recolectar la droga y someter a los procedimientos previos a la extracción, se procedió con la obtención de los extractos (Figura 14). El detalle de dichos procedimientos se muestra a continuación, así como los rendimientos respectivos.

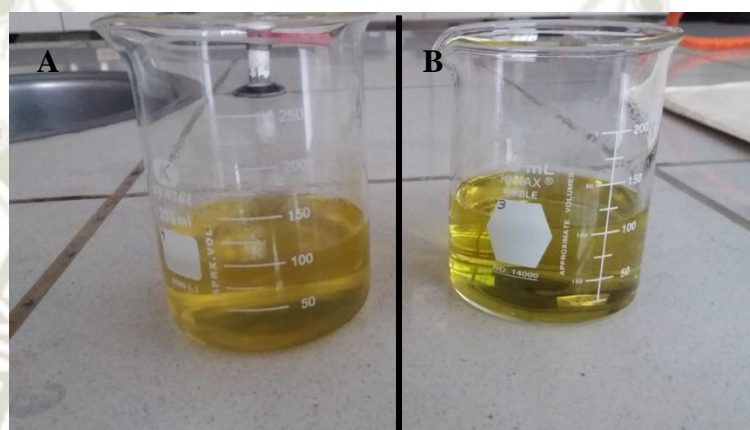


FIGURA N° 14: Extractos de *Ananas Sativus* (piña)

A: Método percolación

B. Método soxhlet

Tabla N° 3: Extracción mediante Soxhlet y su rendimiento

Descripción	1ra Extracción	2da extracción	3ra Extracción	Promedio
Gramos de droga	12	12	12	12
Beaker vacío (gramos)	102.06	103.016	114.7606	---
Beaker + extracto (gramos)	104.26	105.518	117.0754	---
Extracto seco (gramos)	2.2	2.502	2.3148	2.34
Rendimiento (%)	18.33%	20.85%	19.29%	19.00%

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Para la extracción mediante equipo Soxhlet se realizaron cuatro extracciones, sin embargo, para efectos del cálculo se tomaron tres al azar, a fin de poder hacer una comparación descriptiva con el método de percolación en donde se realizaron solo tres extracciones, utilizándose como disolvente alcohol etílico.

En la Tabla N°3 se observa que para este método se tomaron solo 12 gramos de droga en promedio, debido a la capacidad del equipo, el rendimiento promedio fue de 19%, equivalente a 2.34 gramos de peso seco.

En la Tabla N°4 se observa los resultados para el método de extracción mediante percolación, para este método se tomaron 20.48 gramos de droga en promedio, ya que el percolador a diferencia del equipo Soxhlet presenta mayor capacidad, el rendimiento promedio fue de 26%, equivalente a 5.28 gramos de peso seco, como se aprecia el rendimiento fue mayor, ello probablemente se deba a que en este método se utilizó como disolvente alcohol al 70°.

Tabla N° 4: Extracción mediante Percolación y su rendimiento

Descripción	1ra Extracción	2da extracción	3ra Extracción	Promedio
Gramos de droga	21.3874	20	20.056	20.48
Beaker vacío (gramos)	154.14	105.62	107.429	---
Beaker + extracto (gramos)	159.95	110.53	112.528	---
Extracto seco (gramos)	5.81	4.919	5.099	5.28
Rendimiento (%)	27.17%	24.60%	25.42%	26.00%

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el presente estudio se evaluó el tallo de *Ananas sativus* o piña, a través de dos extractos obtenidos mediante dos métodos que utilizan disolventes de tipo continuo, cuyos rendimientos se apreciaron en la Tabla 3 y 4. Al observar de manera conjunta y estableciendo comparaciones, se tiene que la extracción realizada mediante el método de percolación presenta mayor rendimiento en comparación con la extracción realizada con equipo Soxhlet, la diferencia entre promedios coloca al rendimiento de la percolación en un 7% por encima de la extracción con equipo Soxhlet. Teniendo en cuenta que para la extracción con percolador se utilizó una mezcla hidroalcohólica al 70% y para la extracción con Soxhlet alcohol de 96°, es muy probable que la diferencia en la naturaleza de disolventes fue la responsable de esta diferencia. Una mezcla hidroalcohólica constituye un sistema de disolventes que al parecer tendrían en cuanto al tallo de *Ananas sativus* mayor capacidad de extracción, ello es de esperarse ya que el fruto – y por lo tanto el tallo – es rico en contenido

acuoso, por lo que el tenor de sustancias solubles en agua será mayor, lo que repercute en un método de extracción que utiliza una mezcla de etanol y agua.

3.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

El estudio fotoquímico preliminar se realizó mediante el método de cromatografía en capa fina, este ensayo se practicó sobre el extracto del tallo de *Ananas sativus* (piña) obtenido mediante el método de destilación con equipo Soxhlet, ya que este extracto como veremos más adelante es el que mayor eficacia anticoagulante mostro en el estudio *in vitro* realizado.

La primera reacción realizada con el extracto de *Ananas sativus* (piña) fue la reacción general, en esta se utilizó como revelador el ácido sulfúrico y la vainillina en donde los disolventes fueron una mezcla de acetato de etilo, metanol y agua como fase móvil, para lo cual se ha detectado la presencia de metabolitos secundarios (31), como se observa en la (Figura 15).

En cuanto a la identificación de terpenos se utilizó como revelador el reactivo de liebermann burchard, los disolventes fueron una mezcla de acetato de etilo y tolueno como fase móvil, en esta reacción se detectaron compuestos tipo saponinas triterpenos y esteroides con manchas rosas y verdosas respectivamente (32) (33). Como se observar en la (Figura 16).

Por otra parte, para la identificación de taninos se utilizó como revelador el reactivo de cloruro férrico, los disolventes para la fase móvil fueron una mezcla de metanol y agua, donde se identificó una mancha de color marrón que es característico de este tipo de compuestos (Figura 17).

La reacción para compuestos tipo alcaloides fue negativa, este ensayo fue repetido utilizándose como reactivo revelador el Reactivo de Dragendorff, con una fase móvil, que fue una mezcla de ácido acético, metanol y agua.

Para todas las figuras se ilustran sus correspondientes valores de factor de desplazamiento R_f. los compuestos encontrados en un análisis fitoquímico del “Efecto *in vitro* del extracto acuoso de hojas de piña sobre nematodos gastrointestinales de ovinos” fueron similares al análisis cromatográfico realizado en donde se detectó saponinas, triterpenos y esteroides además de taninos.

A propósito de estos compuestos del metabolismo secundario, estos mismo fueron encontrados en un extracto de papaya junto a alcaloides, el screening realizado al extracto que aumento los tiempos de protrombina y tiempo de tromboplastina, detecto la presencia de estos esteroides bajo el estudio denominado Propiedades anticoagulantes y antiplaquetarias del látex de frutos inmaduros de *Carica papaya* L. (Caricaceae), en este contexto es conocida la actividad antiplaquetaria de las saponinas como inhibidoras de la síntesis de tromboxano, por otra parte no se puede dejar de comentar de la propiedad quelante de los taninos sobre el calcio iónico plasmático, además de tener actividad antienzimática.

Las saponinas también fueron reportadas en otras plantas con actividad anticoagulante de uso tradicional como *Careya arbórea* y *Bauhinia forticata* en un artículo de revisión de este tipo de plantas medicinales llamado Una revisión de la Actividad Anticoagulante / Antitrombótica de las plantas naturales utilizadas en la Medicina Tradicional.

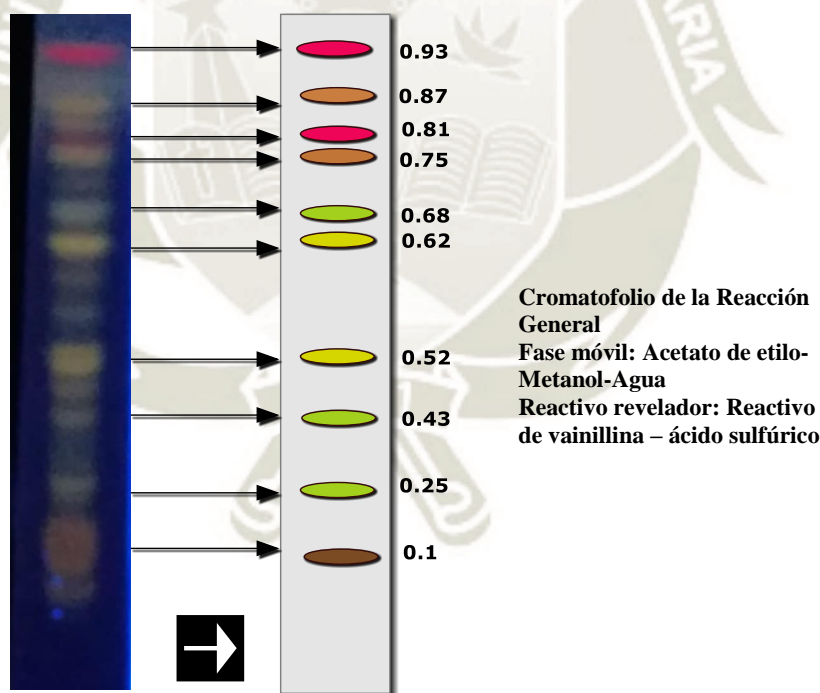


FIGURA N° 15: Identificación general

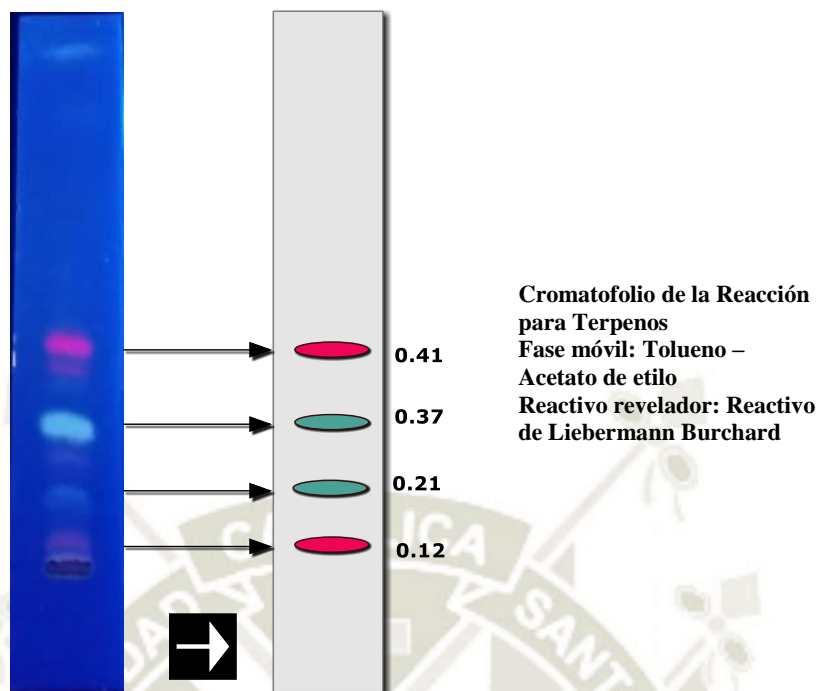


FIGURA N° 16: Identificación de terpenos

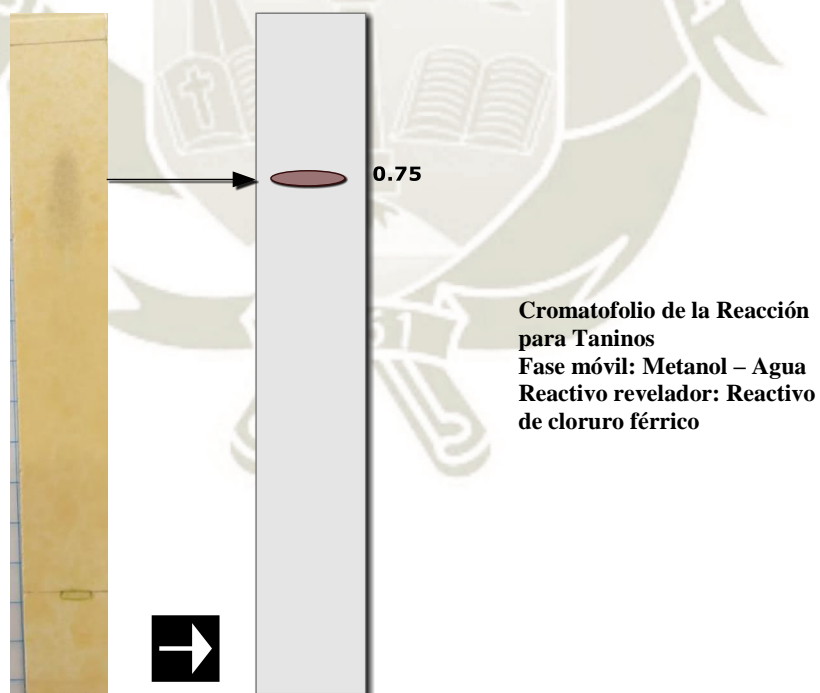


FIGURA N° 17: Identificación de taninos

3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICOAGULANTE

La evaluación del efecto anticoagulante fue realizada en muestras provenientes de 12 sujetos, fueron sometidas estas muestras a tres concentraciones tanto de los extractos de piña obtenidos mediante Soxhlet y Percolación, por lo que para cada concentración se hicieron 12 repeticiones correspondiente a cada muestra sanguínea de cada sujeto. La evaluación del efecto anticoagulante se realizó mediante dos métodos *in vitro*.

3.3.1. Tiempo de coagulación, Método de Burker

El primer método de evaluación anticoagulante fue el Método de Burker, que evalúa el tiempo de coagulación medido en minutos de una muestra de sangre que se pone en contacto sobre una superficie de vidrio.

Tabla N° 5: Tiempo de coagulación (minutos), Método de Burker

Tipo Tratamiento Anticoagulante	N	Media	Mediana	Desv. Desviación	Mínimo	Máximo
Soxhlet Concentración 20%	12	43.80	45.00	4.15	30.63	45.00
Soxhlet Concentración 14%	12	42.25	45.00	9.51	12.05	45.00
Soxhlet Concentración 8%	12	26.97	28.70	18.94	3.50	45.00
Percolación Concentración 20%	12	42.94	45.00	4.82	32.12	45.00
Percolación Concentración 14%	12	35.21	45.00	15.41	6.76	45.00
Percolación Concentración 8%	12	26.13	29.98	14.05	4.55	45.00
Control	12	12.02	12.10	2.21	8.27	15.38

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

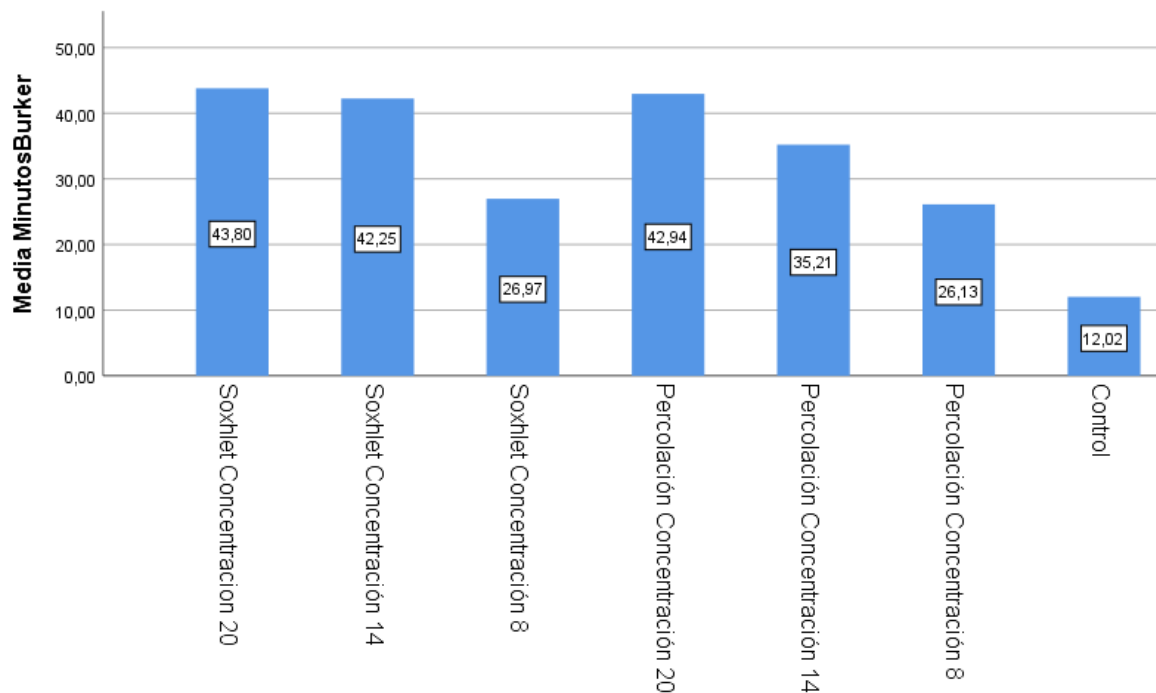


FIGURA N° 18: Grafico del tiempo de coagulación en minutos

La Tabla N° 5 y su respectivo gráfico muestra los resultados para el tiempo de coagulación, de los dos extractos a distintas concentraciones, junto al control. Se observa que el mayor promedio en minutos corresponde de las doce muestras sometidas a la acción del extracto de *Ananas sativus* o piña obtenido mediante Soxhlet a una concentración del 20%, con un tiempo medio de 43.8 minutos, luego se ubican el extracto obtenido mediante este último método pero a una concentración del 14%, junto con el extracto obtenido por percolación a una concentración del 20%, ambos con un valor aproximado de 42 minutos, el resto de extractos tienen respuestas menores, siendo el menor valor correspondiente tanto al extracto obtenido mediante Soxhlet y percolación ambos al 8% con valores medios de 26 minutos, por otra parte el grupo control tuvo un valor de 12.02 minutos como tiempo de coagulación.

Tabla N° 6: ANOVA para el Tiempo de coagulación (minutos), Método de Burker

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9954,14	6	1659,02	12,49	,00
Dentro de grupos	10225,38	77	132,80		
Total	20179,52	83			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Para comparar las seis concentraciones de los dos tipos de extracción (Soxhlet y Percolación) se calculó un Análisis de varianza, mediante el programa estadístico SPSS, el cuadro de resultados para este análisis se muestra en la Tabla N° 6, como se observa se tienen una Significancia igual a 0.00, con un nivel de confianza del 95%, lo que nos permite concluir que los resultados de los seis grupos correspondientes a las tres concentraciones de los dos extractos son diferentes en cuanto al tiempo de coagulación medido en minutos.

Luego del Análisis de varianza se hace necesario otro que compare cada grupo con el resto, con el objetivo de apreciar que grupos en particular son iguales o diferentes respecto de los otros; mediante la Prueba HSD Tukey se puede realizar esta comparación. La Tabla N° 7, muestra los resultados de la Prueba HSD Tukey calculada con el mismo programa estadístico, observamos que todos los grupos muestran eficacia, ya que todos difieren del grupo control, sin embargo, las muestras tratadas con los extractos de *Ananas sativus* o piña obtenidos mediante Soxhlet de concentración al 14 y 20%, junto al extracto de *Ananas sativus* o piña obtenido mediante percolación con una concentración del 20%, son los de mayor eficacia, ya que sus medias y varianzas son estadísticamente diferentes – y superiores – al resto de muestras que recibieron los otros extractos de *Ananas sativus* o piña a concentraciones menores, en cuanto a estos tendrían una eficacia menor.

Tabla N° 7: Test HSD Tukey para el Tiempo de coagulación (minutos), Método de Burker

Tipo Tratamiento Anticoagulante	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control	12	12.02		
Percolación Concentración 8%	12	26.13	26.13	
Soxhlet Concentración 8%	12		26.97	
Percolación Concentración 14%	12		35.21	35.21
Soxhlet Concentración 14%	12			42.25
Percolación Concentración 20%	12			42.94
Soxhlet Concentración 20%	12			43.80
Sig.		,05	,47	,53

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

3.3.2. Tiempo de protrombina, Método de Quick

El otro método para observar la coagulación es el Método de Quick, que mide el tiempo en segundos que le toma a una muestra de plasma citratado, en formar un coágulo, luego de añadirle tromboplastina y posterior recalcificación en presencia de la sustancia problema que en este estudio son los extractos de *Ananas sativus* o piña, obtenidos mediante dos métodos de extracción continuos, a tres concentraciones cada uno.

Previo a la explicación de los resultados es necesario precisar en varios casos tal como veremos en la Tabla N° 8 no se observó la formación de coágulo, en un plazo que supero las 24 horas, es por ello que se vio por conveniente para efectos del análisis estadístico, tomar un periodo límite de 24 horas de observación, y en caso de no observar la formación de un coágulo en un periodo de 24 horas a más, se anotó el tiempo de 86400 segundos que es el equivalente de un día en segundos.

Tabla N° 8: Tiempo de Protrombina (segundos), Método de Quick

Tipo Tratamiento Anticoagulante	N	Media	Mediana	Desv. Desviación	Mínimo	Máximo
Soxhlet Concentración 20%	12	86400.00	86400.00	.00	86400	86400
Soxhlet Concentración 14%	12	80625.00	86400.00	18721.51	21300	86400
Soxhlet Concentración 8%	12	45543.33	46840.00	34416.44	3680	86400
Percolación Concentración 20%	12	79950.00	86400.00	22343.45	9000	86400
Percolación Concentración 14%	12	35943.00	18255.00	36358.25	2106	86400
Percolación Concentración 8%	12	11546.58	5520.00	23011.17	329	83400
Control	12	13.33	13.50	2.42	10	17

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

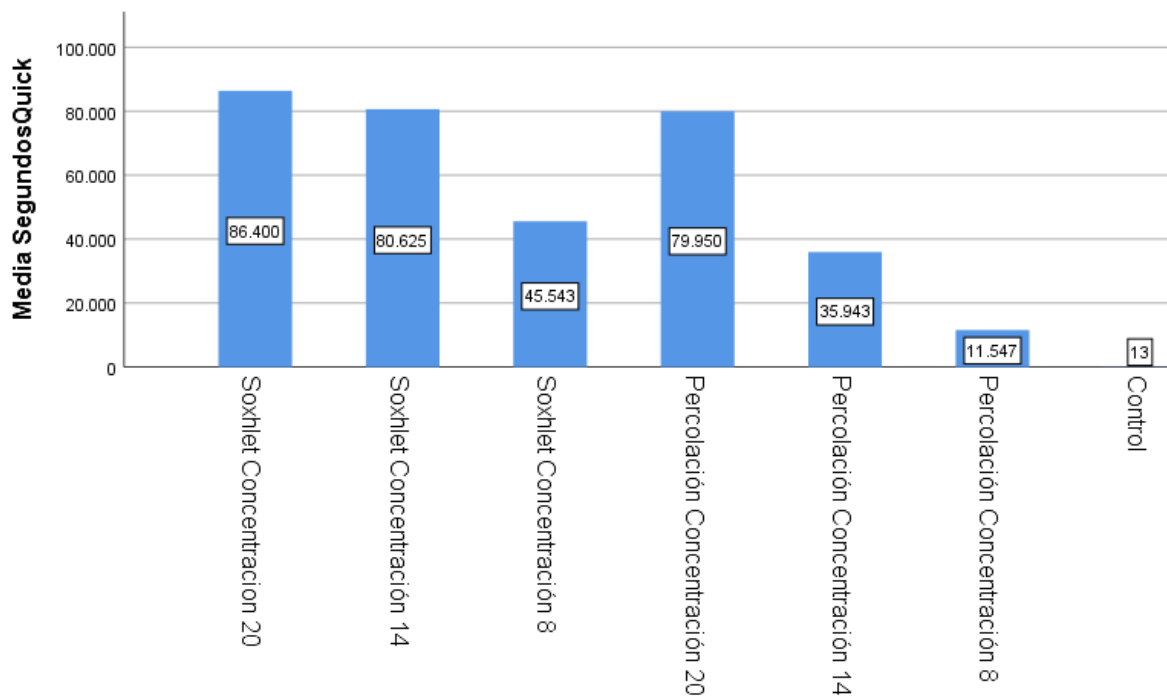


FIGURA N° 19: Grafico del tiempo de protrombina

La Tabla N° 8 y su respectivo gráfico muestra los resultados para el tiempo de protrombina, de los dos extractos a distintas concentraciones, junto al control. Se observa que el mayor promedio en segundos corresponde de las doce muestras sometidas a la acción del extracto de *Ananas sativus* o piña al obtenido mediante Soxhlet a una concentración del 20%, con un tiempo medio de 86400 segundos (24 horas), luego se ubica el extracto obtenido mediante este último método pero a una concentración del 14%, con una media de 80625 segundos, muy cerca el extracto obtenido por percolación a una concentración del 20%, con un valor de 79950 segundo, el resto de extractos tienen respuestas menores, siendo el menor valor correspondiente al extracto obtenido mediante percolación al 8% con un valor medio de 11546 segundos, por otra parte el grupo control tuvo un valor de 13.33 segundos como tiempo de protrombina.

Tabla N° 9: ANOVA Tiempo de Protrombina (segundos), Método de Quick

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	88085055420,64	6	14680842570,11	26,45	,00
Dentro de grupos	42742182352,25	77	555093277,30		
Total	130827237772,89	83			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

También comparar las seis concentraciones de los dos tipos de extracción (Soxhlet y Percolación) se calculó un Análisis de varianza, mediante el programa estadístico SPSS, el cuadro de resultados para este análisis se muestra en la Tabla N° 9, como se observa se tienen una Significancia igual a 0.00, con un nivel de confianza del 95%, lo que nos permite concluir que los resultados de los seis grupos correspondientes a las tres concentraciones de los dos extractos del tallo de *Ananas sativus* o piña son diferentes en cuanto al tiempo de protrombina medido en segundos.

Tabla N° 10: Test HSD Tukey del Tiempo de Protrombina (segundos), Método de Quick

Tipo Tratamiento Anticoagulante	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Control	12	13.33			
Percolación Concentración 8%	12	11546.58	11546.58		
Percolación Concentración 14%	12		35943.00	35943.00	
Soxhlet Concentración 8%	12			45543.33	
Percolación Concentración 20%	12				79950.00
Soxhlet Concentración 14%	12				80625.00
Soxhlet Concentración 20%	12				86400.00
Sig.		,89	,16	,95	,99

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Al ser varios los grupos del Análisis de varianza se hace necesario otro que compare cada grupo con el resto, con el objetivo de apreciar que grupos en particular son iguales o diferentes respecto de los otros; mediante la Prueba HSD Tukey se puede realizar esta comparación. La Tabla N° 10, muestra los resultados de la Prueba HSD Tukey calculada con el mismo programa, observamos a excepción de las muestras tratadas con el extracto de *Ananas sativus* o piña obtenido mediante Percolación a una concentración del 8%; todos los grupos muestran eficacia, ya que todos son diferentes del grupo control, sin embargo, las muestras tratadas con los extractos de *Ananas sativus* o piña obtenidos mediante Soxhlet de concentración al 14 y 20%, junto al extracto de *Ananas sativus* o piña obtenido mediante percolación con una concentración del 20%, son los de mayor eficacia, ya que sus medias y varianzas son estadísticamente diferentes y superiores al resto de muestras que recibieron

los otros extractos de *Ananas sativus* o piña a concentraciones menores, en cuanto a estos tendrían una eficacia menor.

En el presente estudio se evaluó el pedúnculo de *Ananas sativus* o piña, en atención a su probable actividad anticoagulante y fibrinolítica. En cuanto a la actividad anticoagulante, medida mediante el tiempo de coagulación y el tiempo de protrombina, se observó resultados positivos para el extracto de *Ananas sativus* o piña al 20% obtenido mediante el método que utiliza equipo Soxhlet, y también para la percolación a la misma concentración, para el primer caso se utilizó como disolvente el etanol al 96°, en la percolación se utilizó una mezcla hidroalcohólica al 70°, este resultado está relacionado y se apoya en otros resultados como los encontrados en el trabajo denominado Potencial anticoagulante in vitro de *Caulerpa* sp. ("Lato"), *Eucheuma* sp. ("Guso"), *Ananas comosus* ("Piña") y *Psidium guajava* ("Guava") Extractos de hojas en ratones ICR (32); en donde se evaluó un extracto etanólico al 80%, obtenido a reflujo, observando para el caso del extracto de pina el mayor tiempo de coagulación.

Sin duda la droga para los efectos cardiovasculares de *Ananas sativus* o piña es el tallo o más correctamente el pedúnculo del fruto (infrutescencia), ya que en el estudio denominado Efecto de la piña (*Ananas comosus*) sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos en ratas Wistar albinas intoxicadas con Doliprane; en donde se utilizó un extracto proveniente de esta droga, observándose mejores números celulares de parámetros hematológicos evaluados.

Los responsables de este efecto probablemente sea un conjunto activo conformado por compuestos que se han detectado en el tallo y que al igual que la bromelaina tienen actividad enzimática, como son endopeptidasas, glucosidasas, celulasas (33), también se ha descrito la presencia de pectasas e invertasas (3). No pasa todos estos compuestos provenientes del metabolismo primario. No puede pasar desapercibido el análisis cromatográfico realizado en donde se detectó saponinas, triterpenos y esteroides, además de taninos.

Existen investigaciones que relacionan actividad anticoagulante a *Ananas sativus*. En un artículo llamado "efecto sobre el sistema de la coagulación del zumo de frutas y hortalizas peruanas" donde reportan que *Ananas comosus* tiene actividad anticoagulante su extracto acuoso contiene enzimas proteolíticas denominada bromelaina que de acuerdo a estudios in vitro y en animales prolonga el TP, el cual concuerda con nuestros resultados

donde vimos que el extracto de *Ananas sativus* (piña) tiene el mismo efecto in vitro sobre el TP.

3.4. ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA

3.4.1. Método de Prassad

La actividad fibrinolítica se realizó mediante el método de Prassad, para este ensayo solo se trabajó con 10 muestras de sangre proveniente de 10 sujetos diferentes, ello debido a la deserción de dos sujetos, sin embargo, este método se hizo por triplicado, para las tres concentraciones de cada extracto obtenido por Soxhlet y Percolación. Haciendo un total de 30 repeticiones para cada concentración.

Tabla N° 11: Peso medio en gramos del coágulo post administración de tratamientos

Tipo Tratamiento Prassad	N	Media	Mediana	Desv. Desviación	Mínimo	Máximo
Soxhlet Concentración 20%	10	.04	.03	.03	.00	.10
Soxhlet Concentración 14%	10	.05	.04	.04	.01	.14
Soxhlet Concentración 8%	10	.07	.05	.04	.03	.13
Percolación Concentración 20%	10	.06	.04	.05	.01	.16
Percolación Concentración 14%	10	.05	.04	.04	.01	.13
Percolación Concentración 8%	10	.05	.05	.04	.01	.14
Control	10	.05	.05	.04	.00	.13

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

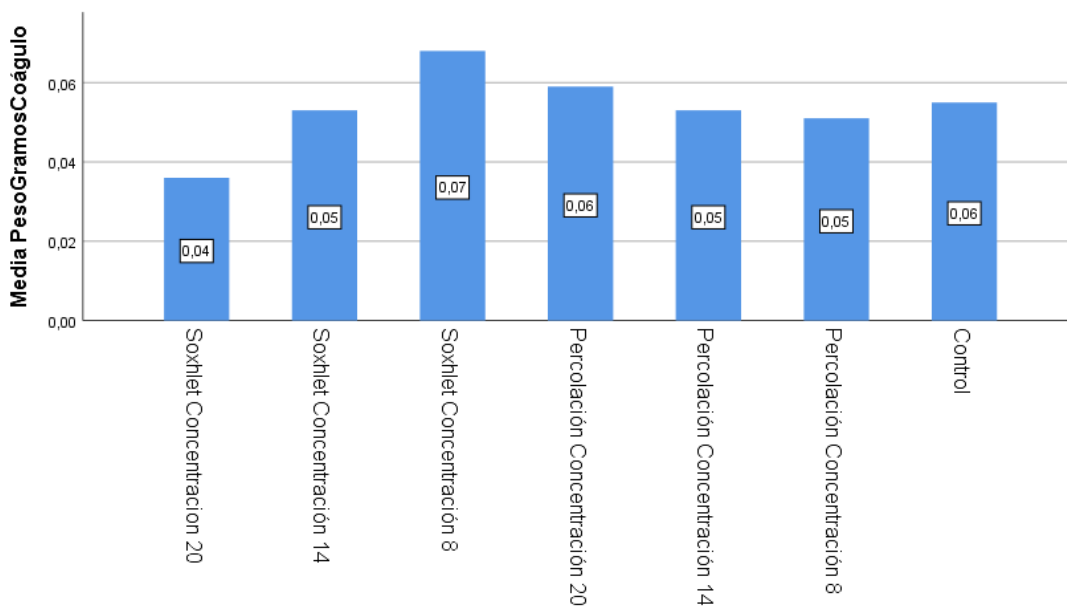


FIGURA N° 20: Gráfico de la actividad fibrinolítica

La Tabla N°11 y su respectivo gráfico muestra los resultados del peso del coágulo remanente post administración de los tratamientos consistentes en tres concentraciones de cada tipo de extracto obtenido por Soxhlet y Percolación. Se observa que el menor peso medio en gramos de coágulo remanente de las diez muestras realizadas por triplicado corresponde al extracto de *Ananas sativus* o piña al obtenido mediante Soxhlet a una concentración del 20%, con un peso medio de 0.04 g, luego se ubican los extractos obtenidos mediante este último método pero a una concentración del 14%, con una media aproximada de 0.05 g junto a los extractos del tallo de *Ananas sativus* o piña obtenidos por percolación a concentraciones de 20, 14 y 8%; el de mayor peso medio en gramos fue el extracto de *Ananas sativus* o piña obtenido mediante destilación en Soxhlet al 8% con un valor medio de 0.07 g de peso del coágulo remanente.

Tabla N° 12: Análisis de Varianza Peso medio en gramos del coágulo post administración de tratamientos

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.01	6	.00	.60	.72
Dentro de grupos	.10	63	.00		
Total	.10	69			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

También se comparó las seis concentraciones de los dos tipos de extracción (Soxhlet y Percolación) mediante el cálculo del Análisis de varianza, mediante el programa estadístico SPSS, el cuadro de resultados para este análisis se muestra en la Tabla N°12, como se observa se tienen una Significancia igual a 0.72, con un nivel de confianza del 95%, lo que nos permite concluir que los resultados de los seis grupos correspondientes a las tres concentraciones de los dos extractos del tallo de *Ananas sativus* o piña son estadísticamente similares en cuanto al peso medio en gramos del coágulo remanente post administración de tratamientos y recalcificación de las muestras de plasma.

Con fines de confirmación del Análisis de varianza se realizó la Prueba HSD Tukey. La Tabla N°13, muestra los resultados de la Prueba HSD Tukey calculada con el mismo programa, observamos que los dos extractos obtenidos por Soxhlet y Percolación en sus tres distintas concentraciones 20, 14 y 8%, son estadísticamente similares a un nivel de confianza del 95%, ya que todos conforman un solo subconjunto, junto con el grupo control.

Tabla N° 13: Test HSD Tukey Peso medio en gramos del coágulo post administración de tratamientos

Tipo Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Soxhlet Concentración 20%	10	.04
Percolación Concentración 8%	10	.05
Soxhlet Concentración 14%	10	.05
Percolación Concentración 14%	10	.05
Control	10	.05
Percolación Concentración 20%	10	.06
Soxhlet Concentración 8%	10	.07
Sig.		.53

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Con referente a la actividad fibrinolítica no se observaron efectos, probablemente esto se deba a la naturaleza de los extractos hace que presenten bajo tenor de bromelaina, la principal enzima sino la única de la actividad fibrinolítica de *Ananas comosus* o piña, en efecto la bromelaina es una enzima proteolítica inespecífica, es por ello que no se

observó la disolución del coágulo, esta actividad de degradación proteica fue ampliamente revisada y discutida, pero sin embargo no se observó en nuestro estudio, la otra posibilidad es que el complejo activo no tenga influencia en los procesos de fibrinólisis. Por ello es fácil suponer que los responsables sería el conjunto activo de metabolitos primarios y secundarios.



CONCLUSIONES

Primera

Se determinó la actividad anticoagulante y fibrinolítica *in vitro* de los extractos del tallo de *Ananas sativus* (piña), obtenidos mediante percolación y Soxhlet, en muestras de sangre humana.

Segunda

Se obtuvieron dos extractos del tallo de *Ananas sativus* (piña) mediante dos métodos, percolación y Soxhlet. Para este último se utilizó como disolvente alcohol etílico 96°, obteniéndose un rendimiento medio de la droga de 19%, para el extracto por percolación se utilizó como disolvente alcohol etílico 70° con un rendimiento medio de 26%.

Tercera

Se analizó mediante cromatografía en capa fina al extracto del tallo de *Ananas sativus* (piña) obtenido mediante destilación con Soxhlet, ya que este extracto fue el de mayor eficacia, se identificó la presencia de metabolitos secundarios para la reacción de terpenos se detectó la presencia de saponinas, triterpenos y esteroides; la reacción para taninos fue positiva; en cambio la reacción para flavonoides y alcaloides fue negativa.

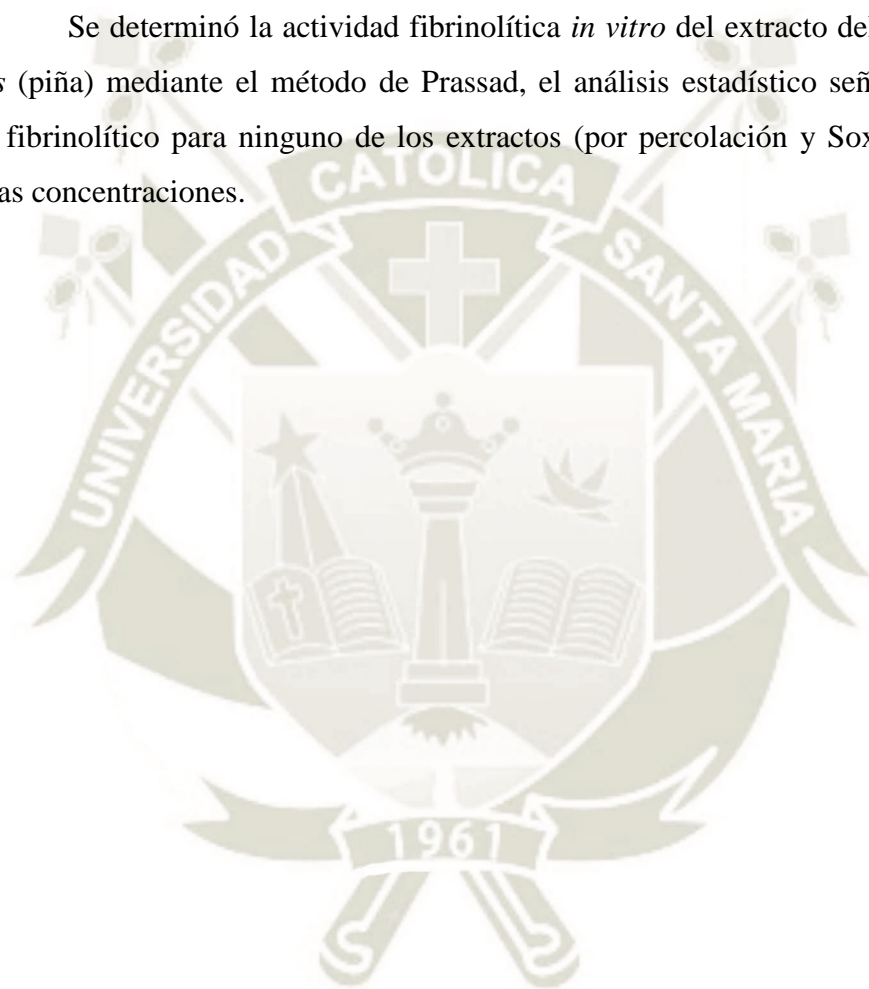
Cuarta

Se determinó la actividad anticoagulante *in vitro* del tallo de *Ananas sativus* (piña) mediante el tiempo de coagulación, presentando efecto anticoagulante los extractos obtenidos por Soxhlet en concentración al 20 y 14%, junto con el extracto obtenido por percolación al 20%; para el resto de concentraciones menores de ambos tipos de extractos las eficacias fueron menores.

En cuanto al tiempo de protombina tuvieron efecto anticoagulante también los extractos obtenidos por Soxhlet en concentración al 20 y 14%, junto con el extracto obtenido por percolación al 20%; el resto de concentraciones menores de ambos tipos de extractos las eficacias fueron menores.

Quinta

Se determinó la actividad fibrinolítica *in vitro* del extracto del tallo de *Ananas sativus* (piña) mediante el método de Prasad, el análisis estadístico señaló que no hubo efecto fibrinolítico para ninguno de los extractos (por percolación y Soxhlet) en sus tres distintas concentraciones.



SUGERENCIAS

Primera

Determinar el efecto anticoagulante y fibrinolítico *in vivo* del extracto del tallo de *Ananas sativus* o piña obtenido mediante destilación con Soxhlet en animales de experimentación.

Segunda

Realizar un estudio toxicológico en animales de experimentación para evaluar la seguridad del extracto del tallo de *Ananas sativus* o piña obtenido mediante destilación con Soxhlet tras la administración *per os*.

Tercera

Determinar el efecto antiagregante plaquetario *in vitro* o *in vivo* del extracto del tallo de *Ananas sativus* (piña) obtenido mediante destilación con Soxhlet en animales de experimentación.

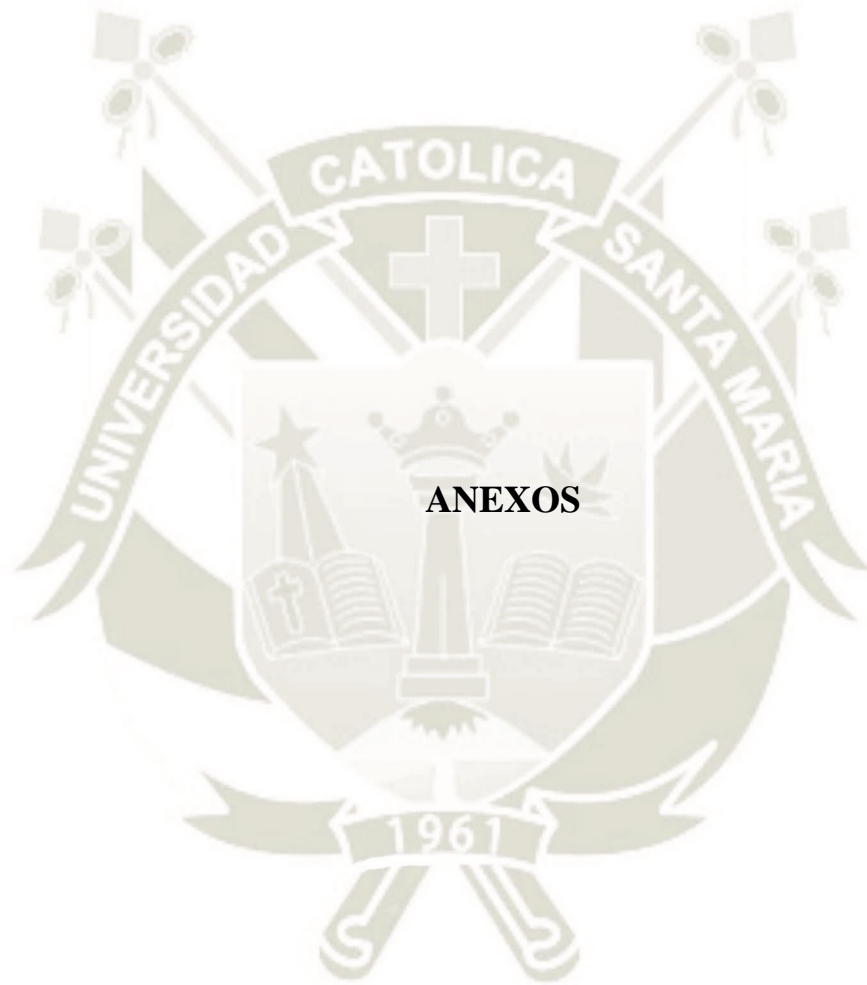
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fundación BBVA. Libro de la Salud Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA. Primera ed. Robles Gardeazabal JJ, editor. Bilbao: Editorial Nerea S.A.; 2009.
2. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. Primera ed. Lima: Normas Legales SAC; 2002.
3. Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Primera ed. Santa Fe: Corpus; 2004.
4. Nuñez Meléndez E. Plantas Medicinales de Puerto Rico. Primera ed. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico; 2006.
5. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. Aspectos Biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia Colombiana. Primera ed. Gonzáles D, editor. Bogotá: Produmedios; 2004.
6. Brack Egg A. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Primera ed. Cusco: Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas; 1999.
7. Autores V. Fitoterapia Vademécum de Prescripción. Cuarta ed. Vanaclocha Vanaclocha B, Cañigueral Folcara S, editors. Barcelona: Masson S.A.; 2003.
8. Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. Ganong Fisiología Médica. Veintitrés ed. México: McGraw-Hill Interamericana S.A.; 2010.
9. Hall J. Guyton y Hall Tratado de fisiología médica. Décimotercera ed. Barcelona: Elsevier España; 2016.
10. Michael J, Sircar S. Fisiología Humana. Primera ed. México: El Manual Moderno S.A.; 2012.
11. Mezquita C. Fisiología Médica Del razonamiento fisiológico al razonamiento clínico. Primera ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011.
12. Kalant H, Roschlau W. Principios Básicos de Farmacología. Sexta ed. México: Oxford University Press; 2002.

13. Brunton LL. Googman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Décimotercera ed. Brunton LL, editor. México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.; 2018.
14. Katzung Bertrand G. Farmacología Básica y Clínica. Doce ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2013.
15. Flórez J. Farmacología Humana. Sexta ed. Barcelona: Elsevier España S.L.; 2014.
16. Adams M, Leland H, Paula B. Farmacología para enfermería. Un enfoque fisiopatológico. Segunda ed. Barcelona: Pearson Educación S.A.; 2009.
17. Katzung BG, Trevor AJ. USMLE Road Map Farmacología. Primera ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
18. Golan D, Tashjian A, Armstrong E, Armstrong A. Principios de Farmacología Bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico. Tercera ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
19. Suárez E, Suárez F, Suárez S. Manual de Farmacología Médica. Primera ed. Rosario: Corpus; 2006.
20. Aristil Chéry P. Manual de Farmacología Básica y Clínica. Primera ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.; 2010.
21. López Castellano A, Moreno Royo L, Villagrasa Sebastián V. Manual de Farmacología. Segunda ed. Barcelona: Elsevier España S.L.; 2010.
22. Lorenzo P, Moreno A, Leza J, Moro M. Velázquez Farmacología Básica y Clínica. Dieciocho ed. México: Médica Panamericana; 2008.
23. Isaza C, Isaza G, Fuentes J, Marulanda T, Buriticá O, Machado J, et al. Fundamentos en Farmacología en Terapéutica. Sexta ed. Manizales: Editorial Médica Celsus; 2014.
24. Dawson B, Trapp R. Bioestadística Médica. Cuarta ed. México: Manual Moderno; 2004.
25. Del Río J. Farmacología Básica. Primera ed. Del Río J, editor. Madrid: Editorial Madrid S.A.; 1996.

26. Ocampo R, Ríos AL, Betancur LA, Ocampo DM. Curso Práctico de Química Orgánica Enfocado a Biología y Alimentos. Primera ed.: Universidad de Caldas; 2008.
27. Jover Botella A, García Bermejo J. Manual del Auxiliar de Farmacia. Primera ed. Sevilla: Mad S.L.; 2004.
28. Beyer H, Walter W. Manual de Química Orgánica. Primera ed. Barcelona: Reverté S.A.; 1987.
29. Suardíaz J, Cruz C, Colina A. Laboratorio Clínico. Primera ed. La Habana: Ciencias Médicas; 2004.
30. Zurita Macalupú S. Procedimientos de Laboratorio. Segunda ed. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2013.
31. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas. 1st ed.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1984.
32. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
33. Wagner H, Bauer R, Merchart D, Staundinger A. Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines Vol. 4. 1st ed.: Springer International Publishing Switzerland ; 2016.
34. Sotta Apaza N. Plantas Medicinales y Aromáticas de la Región Arequipa. Primera ed. Arequipa: Cordaid; 2000.
35. Pastrana Delgado J, García De Casasola Sánchez G. Fisiopatología y Patología general básicas para ciencias de la salud. Primera ed. Barcelona: Elsevier España S.L.; 2013.
36. Hernández Sampieri R. Metodología de la Investigación. Sexta ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2014.
37. Hammer G, McPhee S. Fisiopatología de la Enfermedad Una introducción a la medicina clínica. Séptima ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2015.
38. Rang H, J. R, Flower R, G. H. Rang y Dale Farmacología. Octava ed. Barcelona: Elsevier España S.L.U.; 2016.

39. Hitner H, Nagle B. Introducción a la Farmacología. Quinta ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
40. Hilal-Dandan R, Brunton LL. Googman & Gilman Manual de Farmacología y Terapéutica. Segunda ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.; 2015.
41. Arenajo Aea. In Vitro Anticoagulant Potential of Caulerpa sp. (“Lato”), Eucheuma sp. (“Guso”), Ananas comosus (“Pineapple”) Peeling and Psidium guajava (“Guava”) Leaf Extracts in ICR Mice. Journal of Agriculture and Technology Management (JATM). 2018 January; 21(1).
42. Aranceta J, Gil Á. Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil. Primera ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
43. Zehra Abdul Mea. Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care. Orthopaedics, Department of Surgery. 2017 January; 67(1).
44. Asare Fea. Propiedades anticoagulantes y antiplaquetarias del látex de frutos inmaduros de Carica papaya L. (Caricaceae). International Journal of Basic & Clinical Pharmacology. 2015 November; 4(6).
45. Surjeet Kea. A Review on Anticoagulant/Antithrombotic activity of natural plants used in Traditional Medicine. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2011 May; 6(1).
46. Nipa Tochi Bea. Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. Pakistan Journal of Nutrition. ; 7(4).



ANEXO 1: IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



CONSTANCIA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de tallos, hojas y frutos de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Ananas sativus* L. de la familia Bromeliaceae de nombre común "piña". Dichas muestras fueron obtenidas de la localidad de Huetupehu, departamento de Madre de Dios, para la ejecución de la Tesis titulada: Determinación de la actividad anticoagulante y fibrinolítica in vitro del extracto de *Ananas sativus* L. "piña", Arequipa, 2018 desarrollado por Lizeth Magaly Chuquitarqui Quispe de la Universidad Católica San María.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE : COMMELINIDAE
ORDEN: POALES
FAMILIA: BROMELIACEAE
GENERO: ANANAS
ESPECIE: *Ananas sativus* L.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 10 de Agosto del 2018



Bigo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

ANEXO 2: sábana de datos

Tiempo de coagulación: Extracto de piña con Soxhlet

N° Sujeto	Soxhlet Cc 20%	Soxhlet Cc 14%	Soxhlet Cc 8%
1	45.00	45.00	45.00
2	45.00	12.05	10.05
3	45.00	45.00	45.00
4	45.00	45.00	45.00
5	45.00	45.00	45.00
6	45.00	45.00	45.00
7	30.63	45.00	9.05
8	45.00	45.00	3.50
9	45.00	45.00	10.41
10	45.00	45.00	12.41
11	45.00	45.00	8.21
12	45.00	45.00	45.00

Tiempo de coagulación: Extracto de piña con Percolación

N° Sujeto	Percolación Cc 20%	Percolación Cc 14%	Percolación Cc 8%
1	45.00	45.00	45.00
2	45.00	12.00	9.66
3	45.00	45.00	37.25
4	45.00	45.00	25.36
5	45.00	45.00	45.00
6	45.00	45.00	11.25
7	32.12	13.46	10.03
8	45.00	45.00	32.00
9	45.00	6.76	4.55
10	45.00	45.00	33.45
11	45.00	45.00	29.56
12	33.14	30.25	30.41

Tiempo de Protrombina: Extracto de piña con Soxhlet

N° Sujeto	Soxhlet Cc 20%	Soxhlet Cc 14%	Soxhlet Cc 8%
1	86,400	82,200	13,800
2	86,400	86,400	86,400
3	86,400	86,400	86,400
4	86,400	86,400	86,400
5	86,400	21,300	16,980
6	86,400	86,400	86,400
7	86,400	86,400	5,520
8	86,400	86,400	12,600
9	86,400	86,400	3,680
10	86,400	86,400	45,680
11	86,400	86,400	54,660
12	86,400	86,400	48,000

Tiempo de Protrombina: Extracto de piña con Percolación

N° Sujeto	Percolación Cc 20%	Percolación Cc 14%	Percolación Cc 8%
1	86,400	9,000	9,360
2	86,400	77,760	9,480
3	86,400	18,000	9,000
4	9,000	2,520	370
5	86,400	18,060	11,880
6	86,400	86,400	83,400
7	86,400	86,400	4,740
8	86,400	86,400	6,300
9	86,400	22,500	900
10	86,400	2,106	344
11	86,400	3,720	329
12	86,400	18,450	2,456

Efecto fibrinolítico: Extracto de piña con Soxhlet 20%

N° Sujeto	1ra Repetición			2da Repetición			3ra Repetición		
	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2
1	4.70	5.00	4.98	4.79	5.07	5.06	5.33	5.72	5.67
2	4.73	5.58	5.54	5.27	5.61	5.61	5.27	5.72	5.71
3	5.18	5.58	5.56	5.20	5.50	5.45	5.19	5.62	5.57
4	5.14	5.53	5.53	5.77	6.12	6.12	5.34	5.74	5.73
5	5.24	5.57	5.55	5.14	5.44	5.42	5.16	5.62	5.58
6	4.55	4.96	4.96	5.20	5.62	5.61	5.28	5.65	5.64
7	5.20	5.63	5.61	5.21	5.71	5.66	5.20	5.62	5.52
8	5.12	5.54	5.53	5.30	5.69	5.63	5.27	5.64	5.59
9	5.22	5.68	5.68	5.19	5.56	5.52	5.28	5.66	5.62
10	5.30	5.76	5.55	5.13	5.57	5.52	5.26	5.67	5.63

TV= TUBO VACÍO; T+C1= TUBO MÁS COÁGULO; T+C2= TUBO MÁS COÁGULO DESPUÉS DEL EXTR.

Efecto fibrinolítico: Extracto de piña con Soxhlet 14%

N° Sujeto	1ra Repetición			2da Repetición			3ra Repetición		
	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2
1	5.10	5.39	5.37	5.81	6.12	6.12	5.26	5.72	5.69
2	5.14	5.75	5.73	5.81	6.19	6.19	5.26	5.67	5.63
3	5.19	5.56	5.54	5.25	5.61	5.58	5.29	5.73	5.54
4	5.19	5.60	5.59	5.25	5.59	5.58	5.33	5.77	5.64
5	5.20	5.53	5.47	5.13	5.51	5.50	5.18	5.56	5.56
6	5.26	5.75	5.75	4.98	5.39	5.38	5.24	5.61	5.59
7	5.19	5.71	5.69	5.15	5.60	5.59	5.32	5.78	5.59
8	5.23	5.70	5.63	5.17	5.62	5.61	5.25	5.66	5.63
9	5.13	5.57	5.54	5.28	5.67	5.52	5.29	5.77	5.54
10	5.12	5.51	5.50	5.17	5.55	5.51	5.33	5.76	5.57

TV= TUBO VACÍO; T+C1= TUBO MÁS COÁGULO; T+C2= TUBO MÁS COÁGULO DESPUÉS DEL EXTR.

Efecto fibrinolítico: Extracto de piña con Soxhlet 8%

N° Sujeto	1ra Repetición			2da Repetición			3ra Repetición		
	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2
1	5.24	5.64	5.60	5.13	5.60	5.55	5.17	5.57	5.55
2	5.18	5.52	5.42	5.81	6.32	6.29	5.15	5.56	5.56
3	5.12	5.48	5.44	5.04	5.53	5.49	5.29	5.66	5.60
4	5.38	5.72	5.70	5.04	5.46	5.36	5.33	5.74	5.55
5	5.21	5.50	5.47	5.15	5.53	5.51	5.30	5.75	5.53
6	5.35	5.81	5.78	5.02	5.45	5.41	5.17	5.56	5.49
7	5.26	5.74	5.71	5.12	5.56	5.51	5.15	5.62	5.60
8	5.14	5.56	5.54	5.19	5.64	5.63	5.22	5.60	5.55
9	5.33	5.76	5.61	5.33	5.79	5.56	5.19	5.58	5.57
10	5.26	5.64	5.51	5.27	5.75	5.60	5.19	5.57	5.50

TV= TUBO VACÍO; T+C1= TUBO MÁS COÁGULO; T+C2= TUBO MÁS COÁGULO DESPUÉS DEL EXTR.

Efecto fibrinolítico: Extracto de piña con Percolación 20%

N° Sujeto	1ra Repetición			2da Repetición			3ra Repetición		
	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2
1	5.11	5.55	5.55	4.73	5.03	4.98	5.12	5.50	5.49
2	5.20	5.58	5.51	5.18	5.68	5.51	5.18	5.64	5.62
3	5.14	5.56	5.49	5.15	5.49	5.41	5.18	5.64	5.64
4	5.70	6.06	6.05	5.12	5.42	5.38	5.15	5.53	5.51
5	5.18	5.50	5.46	5.15	5.48	5.47	5.23	5.63	5.58
6	5.14	5.55	5.50	5.14	5.61	5.60	5.18	5.62	5.60
7	5.18	5.65	5.63	5.14	5.54	5.43	5.24	5.71	5.63
8	5.29	5.74	5.69	5.17	5.62	5.69	5.29	5.73	5.69
9	5.33	5.71	5.58	5.25	5.72	5.47	5.35	5.74	5.64
10	5.25	5.62	5.55	5.33	5.76	5.60	5.22	5.59	5.48

TV= TUBO VACÍO; T+C1= TUBO MÁS COÁGULO; T+C2= TUBO MÁS COÁGULO DESPUÉS DEL EXTR.

Efecto fibrinolítico: Extracto de piña con Percolación 14%

N° Sujeto	1ra Repetición			2da Repetición			3ra Repetición		
	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2
1	7.34	7.64	7.61	5.17	5.62	5.58	5.28	5.65	5.65
2	5.26	5.55	5.50	5.51	5.86	5.81	5.31	5.71	5.71
3	5.11	5.53	5.50	5.22	5.70	5.66	5.19	5.57	5.56
4	5.20	5.51	5.47	5.19	5.50	5.48	5.33	5.79	5.73
5	5.18	5.56	5.53	5.14	5.43	5.39	5.32	5.73	5.67
6	5.14	5.51	5.49	5.14	5.57	5.45	5.14	5.54	5.52
7	5.11	5.59	5.57	5.03	5.50	5.50	5.22	5.63	5.61
8	5.15	5.59	5.55	5.17	5.55	5.55	5.24	5.72	5.56
9	5.33	5.80	5.60	5.27	5.69	5.51	5.17	5.56	5.54
10	5.34	5.72	5.67	5.33	5.79	5.53	5.17	5.55	5.53

TV= TUBO VACÍO; T+C1= TUBO MÁS COÁGULO; T+C2= TUBO MÁS COÁGULO DESPUÉS DEL EXTR.

Efecto fibrinolítico: Extracto de piña con Percolación 8%

N° Sujeto	1ra Repetición			2da Repetición			3ra Repetición		
	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2	TV	T+C1	T+C2
1	7.51	7.77	7.73	5.24	5.52	5.47	5.28	5.71	5.55
2	5.11	5.58	5.47	4.79	5.47	5.45	5.15	5.54	5.51
3	5.19	5.68	5.66	5.12	5.54	5.49	5.18	5.60	5.58
4	5.14	5.48	5.44	6.32	6.60	6.58	5.31	5.74	5.61
5	5.03	5.39	5.36	5.24	5.66	5.55	5.20	5.58	5.58
6	5.14	5.58	5.53	4.86	5.31	5.17	5.32	5.78	5.56
7	5.12	5.56	5.54	5.24	5.69	5.68	5.12	5.59	5.59
8	5.13	5.59	5.58	5.16	5.61	5.61	5.16	5.55	5.54
9	5.11	5.49	5.48	5.17	5.55	5.51	5.25	5.69	5.69
10	5.34	5.82	5.67	5.15	5.53	5.51	5.13	5.58	5.57

TV= TUBO VACÍO; T+C1= TUBO MÁS COÁGULO; T+C2= TUBO MÁS COÁGULO DESPUÉS DEL EXTR.