



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación de la influencia del extracto de *Kalanchoe pinnata* sobre los
tiempos de coagulación en muestras sanguíneas humanas**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: ANGELICA JUDIEG FLORES SANMIGUEL

TUTORA: YEIMY MARLENE ROJAS DE HIDALGO

COTUTOR: MARCO ANDRÉS VITERI YÁNEZ

Napo-Ecuador

2024

Carrera de Biotecnología

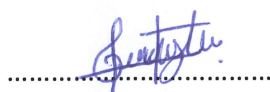
Declaración de derechos de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 23 de agosto de 2024

De mi consideración: Yo, Angelica Judieg Flores Sanmiguel, con documento de identidad N° 1600738676, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Atentamente



Angelica Judieg Flores Sanmiguel

C.I: 1600738676

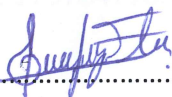
Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 23 de agosto de 2024

De mi consideración: Yo, Angelica Judieg Flores Sanmiguel, con documento de identidad N° 1600738676 en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: "Evaluación de la influencia del extracto de *Kalanchoe pinnata* sobre los tiempos de coagulación en muestras sanguíneas humanas", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines exclusivamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.



Angelica Judieg Flores Sanmiguel

C.I: 1600738676

Carrera de Biotecnología

de dirección de trabajo de titulación

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: “Evaluación de la influencia del extracto de *Kalanchoe pinnata* sobre los tiempos de coagulación en muestras sanguíneas humanas” en la modalidad de: tesis, fue realizado por: Angelica Judieg Flores Sanmiguel, bajo mi dirección.

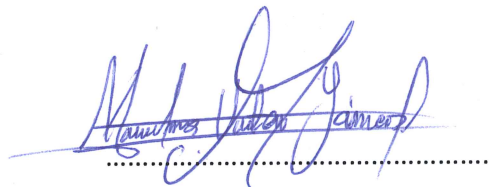
El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 23 de agosto de 2024



Yeimy Marlene Rojas de Hidalgo

C.I: 1757847783



Marco Andrés Viteri Yáñez

C.I: 1718163759

DEDICATORIA

Dedico esta investigación a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por todos los recuerdos y experiencias que me ha brindado, siempre quedarán plasmados en mi mente y mi corazón. Fuiste el lugar donde me di cuenta que los sueños y metas se pueden hacer realidad cuando nos proponemos.

A los profesores de la Facultad de Ciencias de la Vida, me enseñaron que la ingeniería en biotecnología va más allá del conocimiento; se trata de la creatividad, ver más allá de lo común y encontrar la solución frente a cualquier obstáculo.

A mi tutora MSc. Yeimy Rojas y mi cotutor MSc. Marco Viteri, les estoy inmensamente agradecida por su tiempo, paciencia y disposición para llevar a cabo la presente tesis. Por enseñarme y guiarme en los valores y la ética que debo aplicar en mi vida profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios, por darme la fuerza y confianza necesaria para poder culminar con mis estudios universitarios. A mis queridos padres, Diego Patricio Flores Pazmiño y Doris Julissa Sanmiguel Rodríguez. Gracias por haber estado conmigo en cada momento de mi vida universitaria, por confiar en mí, en mí y en mi potencial, por celebrar cada logro, ya sea grande o pequeño, con la misma alegría.

A mis hermanos, Diego, Mateo y Lissethe, les agradezco sus valiosos consejos, comprensión y apoyo incondicional, han sido un pilar fundamental en este proceso.

A mi novio Leonardo, le estoy plenamente agradecida por todo el amor y ánimo que me brindó, pues, su compañía y apoyo me ayudaron a superar todos los obstáculos que se me atravesaron durante el desarrollo de la tesis.

Agradezco profundamente a la Universidad Regional Amazónica Ikiam, no solo por la sabiduría y conocimientos en la formación académica, sino también por las experiencias que enriquecieron mi vida. Ser parte del grupo Ikiam Rock Band y de la selección de baloncesto me permitió conocer a personas maravillosas, quienes ahora considero verdaderos amigos. Esto hizo que pueda desarrollar profesionalmente y como persona.

A todos, gracias por haber sido parte de esta etapa, nunca la olvidaré. Sin duda, todo el amor, apoyo y confianza, han sido requisitos indispensables para mí, para poder alcanzar mis metas, y seguir adelante con determinación y alegría.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA

DEDICATORIA..... v

AGRADECIMIENTO..... vi

RESUMENxii

ABSTRACTxiii

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN 1

1.1. Antecedentes. 4

1.2. Planteamiento del problema 5

1.3. Justificación..... 5

1.4. Objetivos. 6

1.4.1. *Objetivo general*..... 6

1.4.2. *Objetivos específicos*. 6

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO 7

2.1. Permiso de investigación con la especie *K. pinnata* 7

2.2. Recolección de las muestras vegetales 7

2.3. Preparación del extracto de las hojas 7

2.4. Obtención de muestras biológicas..... 8

2.5. Pruebas control para el tiempo de coagulación. 9

2.5.1. *Tiempo de protrombina ("TP")* 9

2.5.2. *Tiempo de tromboplastina ("TTP")*..... 9

2.5.3. *Fibrinógeno* 9

2.6. Estandarización del volumen de muestra y concentración de DMSO. 10

2.7 *Ensayos preliminares con los extractos*..... 10

2.8. Tiempos de coagulación. 11

2.9. Ensayos químicos cualitativos..... 11

2.9.1 *Detección de flavonoides* 11

2.9.2. *Detección de polifenoles* 12

2.9.3. *Detección de terpenoides*..... 12

2.9.4. <i>Detección de alcaloides</i>	12
CAPÍTULO III: RESULTADOS	14
3.1. Rendimiento porcentual de los extractos.....	14
3.2. Ensayos de estandarización del volumen mínimo de muestra.	14
3.3. Ensayos de estandarización con DMSO.....	15
3.4. Ensayos preliminares de tiempo de protrombina, tromboplastina parcial y fibrinógeno con extractos y plasma.	17
3.7. Efecto del extracto metanólico 5 mg/ml sobre los tiempos de coagulación.....	20
3.7.1. <i>Clasificación de las muestras según sus valores de tiempo de coagulación sin extracto.</i>	20
3.7.1.1. <i>Tiempo de protrombina.</i>	20
3.7.1.2. <i>Tiempo de tromboplastina parcial.</i>	21
3.7.1.3. <i>Tiempo de fibrinógeno.</i>	22
3.8. Ensayos químicos cualitativos	23
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	25
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
REFERENCIAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1-2: Condiciones de estandarización de volumen permitido de los diluentes PBS y DMSO.....	20
Tabla 2-3: Porcentaje de rendimiento de 4 extractos (metanólico, de hexano, de cloroformo y acuoso) a partir de 50 gramos de hojas de la especie <i>Kalanchoe pinnata</i>	24
Tabla 3-3: Pruebas de tiempo de coagulación para estandarización del PBS 1X.	25
Tabla 4-3: Pruebas de tiempo de coagulación para estandarización del DMSO.	26
Tabla 5-3: Ensayos para la determinación de metabolitos secundarios de la especie <i>Kalanchoe pinnata</i>	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Especie <i>Kalanchoe pinnata</i>	10
Figura 2-1: Cascada de coagulación; vía extrínseca, vía intrínseca y vía común.	3
Figura 3-3: TP a 3 concentraciones (5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml) con 4 extractos en el plasma sanguíneo de 7 pacientes.	17
Figura 4-3: TTP a 3 concentraciones (5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml) con 4 extractos en el plasma sanguíneo de 7 pacientes..	18
Figura 5-3: Fibrinógeno a 3 concentraciones (5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml) con 4 extractos en el plasma sanguíneo de 7 pacientes.....	19
Figura 6-3: Tiempo de protrombina entre el plasma sin extracto vs plasma con extracto metanólico..	32
Figura 7-3: Tiempo de tromboplastina parcial entre el plasma sin extracto vs plasma con extracto metanólico.....	33
Figura 8-3: Tiempo de fibrinógeno entre el plasma sin extracto vs plasma con extracto metanólico.	34

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Tiempo de protrombina en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue < 11 segundos.

ANEXO B: Tiempo de protrombina en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue ≥ 11 a $\leq 13,5$ segundos.

ANEXO C: Tiempo de protrombina en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue $> 13,5$ segundos.

ANEXO D: Tiempo de tromboplastina parcial en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue < 25 segundos.

ANEXO E: Tiempo de tromboplastina parcial en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue ≥ 25 a ≤ 35 segundos.

ANEXO F: Tiempo de tromboplastina parcial en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue > 35 segundos.

ANEXO G: Fibrinógeno en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue < 18 segundos.

ANEXO H: Fibrinógeno en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue ≥ 18 a ≤ 25 segundos.

ANEXO I: Fibrinógeno en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue > 25 segundos.

RESUMEN

Churiyuyo (*Kalanchoe pinnata*), es una especie perenne suculenta que pertenece a la familia Crassulacea, la cual, ha sido reconocida en las comunidades indígenas amazónicas por las propiedades de sus hojas, que se encargan de mejorar algunos padecimientos frecuentes en la población como son: la hinchazón, la reparación de heridas y la sanación de problemas respiratorios; sin embargo, la práctica ancestral de su uso posee poco respaldo científico. La fitoquímica de las hojas de Churiyuyo, demuestra la presencia de alcaloides, flavonoides y taninos, los cuales, se conocen como compuestos bioactivos responsables de las capacidades curativas que posee dicha planta. En este estudio se evaluaron cuatro tipos de extractos de hojas de Churiyuyo (acuoso, en metanol, en hexano y en cloroformo), los cuales intervienen en la coagulación sanguínea, y por ende, influyen en el proceso de cicatrización. Se midió el efecto que realiza cada uno de los extractos sobre los tiempos de protrombina (TP), la tromboplastina parcial (TTP) y el fibrinógeno. Los resultados mostraron una notable reducción en el tiempo de coagulación sobre el plasma tratado con el extracto metanólico a la concentración de 5 mg/ml, en comparación con el plasma no tratado o tratado con los otros tres extractos.

Palabras clave: Sangre, hemostasia, fitoterapia, biomoléculas.

ABSTRACT

Churiyuyo (*Kalanchoe pinnata*) is a perennial succulent species belonging to the Crassulaceae family. It has been recognized in Amazonian indigenous communities for the properties of its leaves, which are used to alleviate common ailments such as swelling, wound healing, and respiratory issues. However, the ancestral practice of its use has little scientific backing. Preliminary phytochemical analysis revealed the presence of alkaloids, flavonoids, and tannins, known as active compounds responsible for the plant's healing abilities. In this study, we evaluated four types of Churiyuyo leaf extracts (methanolic, aqueous, hexane, and chloroform) for their activity in promoting the blood coagulation process, which is involved in wound healing. The effect of each extract on prothrombin time (PT), partial thromboplastin time (PTT), and fibrinogen was measured. The results showed a significant reduction in coagulation time in plasma treated with the methanolic extract at a concentration of 5 mg/ml, compared to untreated plasma or plasma treated with the other three extracts.

Key words: Blood, hemostasia, phytotherapy, biomolecula

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Ecuador, es un país que se destaca por ser megadiverso tanto en flora como en fauna, principalmente en la región amazónica, en donde alberga un inmenso potencial para el desarrollo de medicina basada en su vegetación (Párraga Espinoza & Vinueza Quinatoa, 2020). Los pueblos indígenas, aprovechan las plantas de la zona para tratar anomalías o trastornos en la salud de las comunidades; un ejemplo popular es la especie *Kalanchoe pinnata* (Kp), comúnmente conocida como “Churiyuyo”, perteneciente a la familia Crassulaceae (Vargas et al., 2022). Es una planta endémica de Madagascar, naturalizada en regiones tropicales, subtropicales, países africanos y de Latinoamérica. Se caracteriza por ser un arbusto perenne y suculenta, con tallo erecto, cilíndrico y poco ramificado que crece verticalmente hasta una altura de 1.50 m; de hojas opuestas con bordes crenados y flores verdes rojizas de forma tubular (observar la Figura 1) (Kumar Biswas et al., 2021). En sus hojas, esta especie cuenta con la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, polifenoles, terpenoides, alcaloides, β -carotenos, entre otros; dichos compuestos bioactivos proporcionan la aceleración de la cicatrización y coagulación (Moreno et al., 2023).



Figura 1. Especie *Kalanchoe pinnata*.

La cicatrización es un proceso fisiológico complejo, dinámico y de influencia multifactorial que se encarga de mantener la integridad de la capa endotelial posterior a traumatismos (Reinke & Sorg, 2012). Asimismo, tiene una serie de eventos biológicos que incluye la hemostasia, la inflamación, proliferación y finalmente la remodelación del tejido. La coagulación interfiere en la primera fase de la cicatrización de heridas (Cambroner Ulate et al., 2022). Dentro del campo de la hematología, se conceptualiza a la coagulación como; la primera y esencial respuesta ante lesiones en la capa endotelial al asegurar la detención del sangrado, preservando la integridad del sistema vascular (Sang et al., 2021). Este mecanismo cuenta con una cascada que empieza por la adhesión plaquetaria; proceso que permite la liberación de proteínas activadoras que desencadenan los factores de la cascada de coagulación (Satyam et al., 2019).

La cascada de coagulación se da por 3 vías (Figura 2), la primera llamada vía intrínseca; inicia tras un daño vascular, donde se activa el factor XII, cuya función es catalítica, convirtiendo la PK (precalicreína) en calicreína y esta potenciada por los QAPM (quininógenos de alto peso molecular), actúan sobre el factor XII y lo convierte en factor XIIa (Jurado et al., 2021). Seguido, el factor XI más cationes de Calcio, activan el factor XI a XIa (Factor XIa) (Jurado et al., 2021). El factor IXa con el factor VIIIa, fosfolípidos y Cationes de calcio, activan al FX (Factor X) (Santana-Romo & Zacconi, 2023). Continuando se encuentra la vía extrínseca; se produce en respuesta a lesiones en los tejidos, liberando FT (factor tisular), que activa al factor VII, y este, por la presencia de cationes de Calcio y fosfolípidos, desencadenan el FX, en consecuencia, ambas convergen en la vía común por el FX, donde el objetivo es, transformar la protrombina en trombina, y la trombina al unirse con las proteínas de fibrinógeno, forman fibrina sintetizando el tapón hemostático (Reyes Gil, 2019).

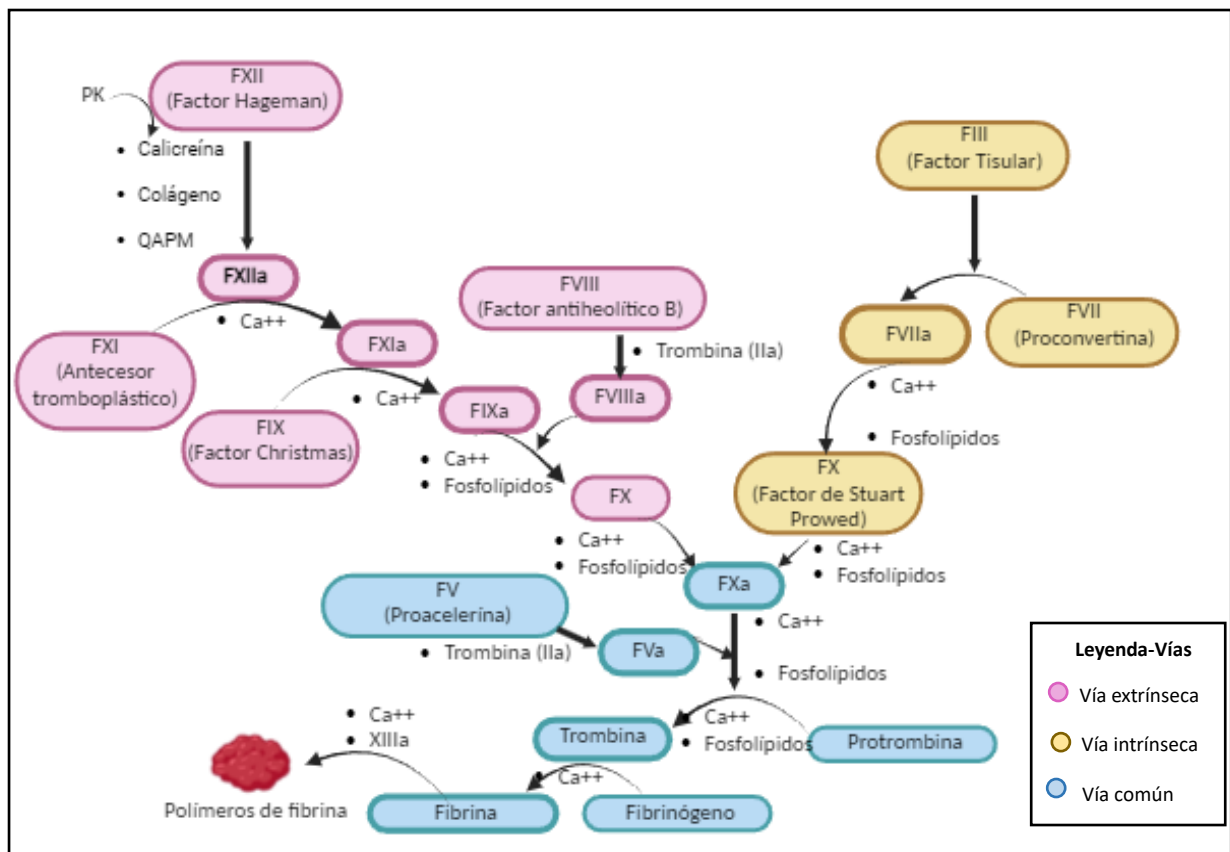


Figura 2. Cascada de coagulación; vía extrínseca, vía intrínseca y vía común.

Para evaluar estas 3 vías, se utiliza la medición de los tiempos de coagulación, los cuales son: el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo parcial de tromboplastina (TPP), los cuales evalúan la vía extrínseca e intrínseca respectivamente y el tiempo del fibrinógeno (la vía común) (Hernández-Pérez et al., 2022). Si alguno de estos tiempos supera los valores normales establecidos para la población mundial, se puede sospechar de la presencia de trastornos hemorrágicos con un riesgo de pérdida de sangre (Vayne et al., 2021). Como se mencionó en párrafos anteriores, las hojas de la especie *Kalanchoe pinnata* son usadas por conocimiento ancestral, para sanar heridas, detener el sangrado y regenerar los tejidos. Es por ello que, en el presente estudio demostraremos de manera experimental la actividad coagulante de esta especie, mediante la medición de los tiempos de coagulación TP (vía extrínseca, representado con color rosado en la Figura 2) , TPP (vía intrínseca, representado con color amarillo en la Figura 2) y fibrinógeno (vía común, representado con color celeste en la Figura 2), con el fin de potenciar el

conocimiento científico respecto a las propiedades biológicas y medicinales atribuidas a la planta.

1.1. Antecedentes.

Investigaciones realizadas con las hojas del Kp han comprobado que los metabolitos y compuestos bioactivos de esta especie; son los responsables de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas y antiinflamatorias que posee esta variedad (Rahman et al., 2019). La planta se ha descrito por su actuación durante el tratamiento del cáncer, debido a los fitoquímicos que revierten los cambios epigenéticos asociados con la resistencia de tumores a las terapias, ya que, participan a través de la metilación, regulando así la proliferación y migración celular, apoptosis, angiogénesis, metástasis, estrés oxidativo y autofagia (Hernández-Caballero et al., 2022).

El extracto acuoso de Kp, es eficaz en la prevención en enfermedades alérgicas relacionadas a las vías respiratorias por la presencia de flavonoides como la quercetina (QE), donde, los QE disminuyen el desarrollo de hiperreactividad e inflamación de las vías respiratorias, inhibiendo la desgranulación y la producción de citocinas de mastocitos, siendo así, una planta inmunomoduladora (Cruz et al., 2012). La actividad más estudiada de “Churiyuyo” es la antimicrobiana; debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de una amplia gama de bacterias como: *Candida albicans*, *Corynebacterium diphtheriae* ZMF, *Cutibacterium acnes*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans*, *Streptococcus equinus* y *Helicobacter pylori* (causantes de bronquitis crónica, neumonía, otitis, uretritis, artritis e infecciones oculares y cutáneas) (Stefanowicz-Hajduk et al., 2023). Los compuestos fenólicos de la planta son metabolitos responsables de la acción antioxidante; protegiendo la acción directa de los radicales libres, formando un mecanismo de respuesta para evitar el estrés oxidativo en los organismos (Moreno et al., 2023). Dentro del área de la odontología; se han realizado estudios para posibles aplicaciones del Kp, como son: enjuagues bucales para combatir microorganismos causantes de patologías dentales como: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, en donde, los

resultados obtenidos fueron favorables, asumiendo en las 4 cepas zonas de inhibición (T, 2021).

A pesar de que estos hallazgos ofrecen perspectivas prometedoras para el uso de la especie como una alternativa terapéutica, en varios campos de la medicina, no existen investigaciones que se enfoquen en la propiedad cicatrizante de la especie *K.pinnata*, ya que, comúnmente las comunidades indígenas utilizan la hoja para tratar heridas superficiales de la dermis.

La cicatrización, es el mecanismo de funciones proteicas en cascada, para una correcta reparación de las heridas, conformada por 4 etapas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Reinke & Sorg, 2012). La hemostasia inicia la formación de coágulos que contienen fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondina al mismo tiempo (Cambroner Ulate et al., 2022). Por ello, mediante las pruebas de tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial (TTP) y fibrinógeno; se puede comprobar experimentalmente la eficacia del extracto de la especie *Kalanchoe pinnata* sobre la actividad coagulante del plasma sanguíneo (Dorgalaleh et al., 2021).

1.2. Planteamiento del problema

El uso de Kp, por parte de las comunidades indígenas ecuatorianas para tratar heridas, cuenta con una amplia evidencia anecdótica que respalda su eficacia en la curación de traumatismos, sin embargo, no existen investigaciones que respalden y validen estos usos medicinales lo que limita su reconocimiento y aplicación en la práctica médica convencional.

1.3. Justificación.

Las comunidades indígenas han verificado y atestiguado que, al aplicar este extracto en forma de gotas sobre traumas epiteliales, actúa como un promotor de la curación de las heridas, entender el mecanismo de acción y la identificación de posibles interacciones

con otros tratamientos médicos; permite aprovechar plenamente el potencial terapéutico de la planta, al igual que, la oportunidad de desarrollar productos o medicamentos basados en sus propiedades curativas.

Al estudiar la actividad coagulante de *Kalanchoe pinnata*, permite no solo establecer conexiones significativas entre la medicina tradicional y la ciencia, sino que, permite desarrollar terapias efectivas y accesibles, con el potencial de generar un impacto positivo en la salud pública.

1.4. Objetivos.

1.4.1. *Objetivo general.*

- Evaluar el efecto de los extractos de *Kalanchoe pinnata* sobre los tiempos de coagulación del plasma humano.

1.4.2. *Objetivos específicos.*

- Estandarizar los ensayos de coagulación con los reactivos comerciales, diluentes y plasma.
- Determinar el extracto de la hoja de *Kalanchoe pinnata* que tiene actividad promotora de la coagulación sanguínea.
- Establecer la concentración del extracto de Kp que disminuya los tiempos de coagulación.
- Identificar los metabolitos presentes en la hoja del Kp mediante un perfil fitoquímico cualitativo.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Permiso de investigación con la especie *K. pinnata*

Se realizó el procedimiento estandarizado según las directrices establecidas por el MAATE-CMARG-2023-0017 para el acceso a recursos genéticos de *Kalanchoe pinnata*.

2.2. Recolección de las muestras vegetales

La recolección se realizó en la ciudad de Tena, en el barrio Las Palmas (0.986112, -77.815147), para llevar a cabo la investigación correspondiente. Una de las muestras fue introducida al herbario para su identificación, y la misma fue verificada como *Kalanchoe pinnata* (colección 01), por la Universidad Estatal Amazónica, localizada en la provincia de Pastaza, cantón Santa Clara.

2.3. Preparación del extracto de las hojas

Las hojas fueron transportadas al laboratorio de productos naturales de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Las muestras vegetales se sometieron a un proceso de limpieza mediante lavado con agua destilada, seguido de un periodo de secado en una estufa a una temperatura constante de 45 grados centígrados por un lapso de 3 días (Saravanan et al., 2020).

Las hojas secas fueron trituradas y tamizadas para facilitar la mezcla con los solventes. Posteriormente, se agregaron 50 g de las hojas previamente tamizadas en una proporción 1:10 con 500 ml de cada uno de los solventes en 4 botellas ámbar por separado, siendo los solventes: metanol, cloroformo, hexano y agua destilada (Vega et al., 2024). Se dejó en maceración durante 9 días. Al finalizar este tiempo, se filtraron las soluciones para separar la capa vegetal de cada uno de los extractos de hojas (metanólico, clorofórmico, hexánico y acuoso). Los solventes se evaporaron mediante el

uso de rotavapor hasta que el volumen se redujera a 10 ml, los cuales se colocaron en viales sin tapa y se liofilizaron al vacío.

Los extractos liofilizados se pesaron para calcular el rendimiento de la extracción. Posteriormente, se prosiguió a pesar 5 mg, 10 mg y 20 mg de cada uno, y fueron diluidos con 2% de DMSO en PBS 1X en tubos de 1.5 ml. Luego de etiquetar cada tubo con la identificación del extracto y su concentración, las soluciones de trabajo fueron almacenadas a una temperatura de 2-8 °C hasta el día programado para el análisis de los tiempos de coagulación (Saravanan et al., 2020).

Adicionalmente, se determinó el rendimiento porcentual del extracto (%R), tomando los datos de peso de las hojas secas (W_i) y de los extractos una vez evaporado el solvente (W_f) (Benítez-Benítez et al., 2020). Con ese propósito, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{W_f}{W_i} \times 100\%$$

2.4. Obtención de muestras biológicas.

Un total de 50 muestras de sangre fueron donadas por el laboratorio de la Cruz Roja de Napo, a quienes se les garantizó que su uso fuera exclusivamente para el desarrollo de esta investigación. Todas las muestras, previo a su donación, fueron clasificadas como residuos biológicos y se entregaron sin proporcionar datos de los pacientes para preservar la confidencialidad.

Las muestras de plasma fueron recolectadas en tubos con citrato de sodio como anticoagulante (tubos tapa azul), centrifugadas, separadas y almacenadas en una refrigeradora a una temperatura de 2-8 °C (Reibán Espinoza et al., 2020). Del total de muestras donadas, únicamente 42 muestras fueron utilizadas ya que tenían un volumen suficiente (4 ml) para ser incluidas en la presente investigación.

2.5. Pruebas control para el tiempo de coagulación.

En el laboratorio de análisis clínico de la institución Cruz Roja de Napo, se desarrollaron los tiempos de coagulación (TP, TTP y fibrinógeno).

2.5.1. Tiempo de protrombina (“TP”)

Para el tiempo de protrombina, se tomaron 50 µl de plasma y se colocaron en una cubeta de coagulómetro, donde se incubaron durante 3 minutos. Enseguida, se agregaron 100 µl de reactivo de “TP” (*Hemostat Thromboplastin-SI*) al plasma incubado, y el equipo semiautomático lector de los tiempos de coagulación (*Human Humaclot Junior Coagulation Analyzer*) procedió a leer el resultado de manera inmediata.

2.5.2. Tiempo de tromboplastina (“TTP”)

En cuanto al tiempo de tromboplastina parcial, se siguió un proceso similar al TP; se añadieron 50 µl de plasma a una cubeta de coagulómetro y se incubaron por 2 minutos. Luego, se agregaron 50 µl del reactivo “TTP” (*Hemostat aPTT-EL*) al plasma incubado y se esperaron 3 minutos. Para culminar, al cabo del tiempo designado, se colocaron 50 µl de cloruro de calcio (marca QuikCoag), y el equipo leyó el resultado.

2.5.3. Fibrinógeno

Para el tiempo de fibrinógeno, se utilizó el kit *Hemostat Fibrinogen*. Se diluyeron 25 µl de plasma con 225 µl del reactivo B del kit (solución tamponada de imidazol con estabilizante). De esta mezcla, se extrajeron 100 µl y se ubicaron dentro de una cubeta de coagulómetro. Seguidamente, se agregaron 70 µl del reactivo A del kit (reactivo de fibrinógeno) en otra cubeta, ambas fueron incubadas por 2 minutos (López-Villarreal et al., 2023). Consecuentemente, se añadieron 50 µl del reactivo A previamente incubado dentro de la solución del plasma e imidazol, y se procedió a la lectura y anotación del tiempo de coagulación (Elbaz & Sholzberg, 2020).

2.6. Estandarización del volumen de muestra y concentración de DMSO.

Para determinar el volumen mínimo de muestra que no altera los resultados de las pruebas de coagulación, se realizó variación de los volúmenes de muestra con 75, 80 y 90 μl (VA, VB y VC, respectivamente), y se completaron con los diluentes (PBS 1X y DMSO) hasta los 100 μl requeridos en el protocolo comercial (Ver tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de estandarización de volumen permitido de muestra y DMSO.

VARIACIONES APLICADAS A LAS MUESTRAS	VOLUMEN DE PLASMA (μl)	VOLUMEN DE DILUENTE PBS (μl)	VOLUMEN DE DILUENTE DMSO (μl)	VOLUMEN FINAL (μl)
VA-PBS	75	25	-	100
VB-PBS	80	20	-	100
VC-PBS	90	10	-	100
VA-DMSO	75	-	25	100
VB-DMSO	80	-	20	100
VC-DMSO	90	-	10	100
SIN VARIACIÓN (SV)	100	-	-	100

Los resultados de los tiempos de coagulación de muestras sin diluyente (“SV”) se compararon con los obtenidos en cada prueba VA, VB y VC. Se seleccionó únicamente aquel volumen que no generó cambios en los tiempos de coagulación.

2.7 Ensayos preliminares con los extractos.

Para identificar el extracto con capacidad de reducir alguno de los tiempos de coagulación, se realizaron ensayos preliminares con cada uno de los extractos sobre 7 muestras seleccionadas al azar. El volumen disponible de cada muestra sólo permitió el ensayo en tres concentraciones (5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml) del extracto (10 μl de extracto en 90 μl de la muestra).

Los resultados de las pruebas de coagulación con cada extracto se compararon con los resultados de las muestras sin extracto (100 µl de la muestra) y la diferencia, nos permitió determinar cuál extracto estimula la actividad coagulante.

2.8. Tiempos de coagulación.

Después de obtener los resultados preliminares, se seleccionó al extracto metanólico como único con la capacidad de reducir los tiempos de coagulación. Por ello, se prosiguió a realizar los ensayos de coagulación en 35 muestras donadas por la Cruz Roja de Napo, utilizando dicho extracto a una concentración de 5 mg/ml y repitiendo la metodología de los ensayos preliminares.

Para finalizar, los resultados fueron tabulados y clasificados en tres grupos para cada prueba de coagulación (TP, TTP y fibrinógeno), según los datos obtenidos en el plasma sin extractos. El primer grupo incluyó aquellos resultados menores a los valores normales para la síntesis de coágulos, el segundo grupo abarcó los valores dentro del rango normal (TP: ≥ 11 a $\leq 13,5$, TTP: ≥ 25 a ≤ 35 y fibrinógeno: ≥ 18 a ≤ 25 segundos), y el tercer grupo consistió en resultados mayores a los valores normales.

Todos los datos obtenidos se registraron en *Excel* 2016 y se realizaron las gráficas correspondientes en *Graphpad Prism* 9.3.0 para el análisis y comparación de los resultados obtenidos con ANOVA.

2.9. Ensayos químicos cualitativos

2.9.1 Detección de flavonoides

Se pesaron 5 mg de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo. Adicionalmente, se pesaron 5 mg de quercetina, se disolvieron en 200 µl de metanol y se completaron a 10 ml con agua destilada; a esta solución se le añadieron 2 ml de NaOH al 4% para servir como control positivo. A su vez, se preparó el control negativo mezclando 2 ml de agua

destilada con 2 ml de NaOH al 4%. Posteriormente, se agregaron 10 gotas de HCl en cada tubo y se observó la coloración resultante. El cambio de color amarillo a una tonalidad incolora es señal de positivo para flavonoides (Adedapo et al., 2013).

2.9.2. Detección de polifenoles

Se pesaron 5 mg de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo. Después, se añadieron 1ml de agua destilada a cada extracto. Para el control positivo, se diluyeron 5 mg de quercetina en 10 ml de agua destilada; de esta solución se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de ensayo. Como control negativo, se utilizó 1 ml de agua destilada. Finalmente, se añadieron 0.5 ml de la solución de cloruro férrico al 1%, a cada tubo y se observaron los cambios de coloración. La presencia de polifenoles en los extractos se pudo visualizar con coloraciones violeta, azul, negro o verde oscuro (Yarlequé Chocas et al., 2020).

2.9.3. Detección de terpenoides

Se pesaron 5 mg de cada extracto y se los colocó dentro de un tubo de ensayo. Después, se añadió 1 ml de metanol a los tubos de ensayo que contenían los extractos. Para el control positivo, se tomaron 2 ml del linalool al 5.31% con 1 ml de metanol y se ubicaron en un tubo de ensayo. Para el control negativo, se mezcló 1 ml de agua destilada con 1 ml de metanol. Se esperó una hora. Transcurrido el tiempo sugerido, se añadió 1 ml de cloroformo y 1 ml de ácido sulfúrico en los 6 tubos lentamente, hasta la formación de una doble fase. El color café pardo en la interfase en los extractos es señal de terpenoides (Castillo & Moncayo, 2021).

2.9.4. Detección de alcaloides

Para empezar, 12 mg de cada extracto fueron pesados y colocados en tubos de ensayos. Para el control positivo se pesaron 5 mg de atropina. A continuación, en los tubos de ensayo se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico al 10 %. Para el control negativo se

agregaron 2 ml de agua destilada. Para terminar, se colocaron 5 gotas del reactivo de Dragendorff. En este caso, los tubos que dieron precipitado marrón son positivos en alcaloides (Sabdoningrum et al., 2021).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Rendimiento porcentual de los extractos.

El peso inicial (W_i) de las hojas de Kp para todos los solventes fue de 50 gramos. Una vez liofilizados, se obtuvo un peso final (W_f) con variaciones en decimales. La Tabla 2 muestra el rendimiento de cada uno de los extractos.

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento de 4 extractos (metanólico, hexánico, clorofórmico y acuoso) a partir de 50 gramos de hojas de la especie *Kalanchoe pinnata*.

SOLVENTE	PESO	W_i (gramos)	W_f (gramos)	%R
METANOL		50	11.34	22.68 %
HEXANO		50	10.42	20.84%
CLOROFORMO		50	10.37	20.74%
AGUA		50	10.61	21.22%

3.2. Ensayos de estandarización del volumen mínimo de muestra.

Los tiempos de coagulación de los 7 pacientes no se vieron afectados al utilizar 75, 80 y 90 μ l de muestra con 25, 20 y 10 μ l de solución salina tamponada (PBS 1X), respectivamente (Tabla 3). Puesto que, el valor obtenido en la muestra sin variación (SV), es decir, el plasma sin diluyente fue el mismo que el obtenido al añadir 25 μ l de PBS 1X (Tabla 3). Por esta razón, se decidió que el volumen mínimo de muestra que se utilizará en los ensayos con los extractos es de 75 μ l.

Tabla 3. Pruebas de tiempo de coagulación para estandarización de PBS 1X.

PACIENTE	PRUEBAS	SV	25 μl
1	TP (segundos)	11.4	11.4
	TTP (segundos)	30.7	30.7
	FIBRINÓGENO (segundos)	12.5	12.5
	TP (segundos)	12.8	12.8

2	TTP (segundos)	27.0	27.0
	FIBRINÓGENO (segundos)	11.9	11.9
3	TP (segundos)	13.6	13.6
	TTP (segundos)	29.4	29.4
	FIBRINÓGENO (segundos)	13.1	13.1
4	TP (segundos)	11.7	11.7
	TTP (segundos)	31.8	31.8
	FIBRINÓGENO (segundos)	10.2	10.2
5	TP (segundos)	11.3	11.3
	TTP (segundos)	25.4	25.4
	FIBRINÓGENO (segundos)	12.1	12.1
6	TP (segundos)	13.9	13.9
	TTP (segundos)	28.5	28.5
	FIBRINÓGENO (segundos)	11.6	11.6
7	TP (segundos)	11.0	11.0
	TTP (segundos)	29.3	29.3
	FIBRINÓGENO (segundos)	13.2	13.2

3.3. Ensayos de estandarización con DMSO.

Al añadir 25 µl de DMSO a 75 µl plasma, se observaron alteraciones en el tiempo de coagulación, puesto que se alargaron los tiempos en todos los ensayos de cada muestra, en comparación con el plasma sin diluyente (SV), incrementando así el tiempo de coagulación en las 3 pruebas.

Con la adición de 20 µl de DMSO en 80 µl de plasma, los resultados demostraron modificaciones, ya que al igual que el volumen del diluyente utilizado anteriormente (25 µl de DMSO), los resultados del tiempo de coagulación aumentaron con respecto al plasma sin extracto.

Por otra parte, al añadir 10 µl de DMSO a 90 µl de plasma, no se visualizaron alteraciones en los tiempos de coagulación, ya que se obtuvieron los mismos valores que en el SV para TP, TTP y fibrinógeno.

Tabla 4. Pruebas de tiempo de coagulación para estandarizar la concentración de DMSO.

PACIENTE	PRUEBAS	SV	25 µl	20 µl	10 µl
1	TP (segundos)	11.4	23.8	17.2	11.4
	TTP (segundos)	30.7	51.3	43.6	30.7
	FIBRINÓGENO (segundos)	12.5	25.2	20.0	12.5
2	TP (segundos)	12.8	21.4	15.7	12.8
	TTP (segundos)	27.0	38.2	33.5	27.0
	FIBRINÓGENO (segundos)	11.9	18.1	14.3	11.9
3	TP (segundos)	13.6	21.6	15.4	13.6
	TTP (segundos)	29.4	37.5	33.8	29.4
	FIBRINÓGENO (segundos)	13.1	19.2	15.3	13.1
4	TP (segundos)	11.7	21.2	14.9	11.7
	TTP (segundos)	31.8	40.4	33.6	31.8
	FIBRINÓGENO (segundos)	10.2	15.7	13.8	10.2
5	TP (segundos)	11.3	23.5	16.2	11.3
	TTP (segundos)	25.4	32.1	27.6	25.4
	FIBRINÓGENO (segundos)	12.1	18.9	15.3	12.1
6	TP (segundos)	13.9	20.7	16.4	13.9
	TTP (segundos)	28.5	35.0	32.2	28.5
	FIBRINÓGENO (segundos)	11.6	19.6	14.1	11.6
7	TP (segundos)	11.0	17.4	15.3	11.0
	TTP (segundos)	29.3	36.7	32.8	29.3
	FIBRINÓGENO (segundos)	13.2	20.1	16.2	13.2

Por lo anterior se muestra que el DMSO al 10% o menos, no induce cambios en los tiempos de coagulación es por ello que se valida que la concentración del 2% usado en la dilución de los extractos no afecta a los ensayos de coagulación (Concentración final de DMSO 0.02%).

3.4. Ensayos preliminares de tiempo de protrombina, tromboplastina parcial y fibrinógeno con extractos y plasma.

Los ensayos de estandarización previos permitieron determinar qué extracto tuvo efecto sobre los tiempos de coagulación. La Figura 3 mostró que no hay diferencia significativa entre el plasma sin extracto con respecto al plasma con los 4 extractos a diferentes concentraciones en el ensayo de tiempo de protrombina (TP). Sin embargo, con 5 mg/ml el extracto metanólico tuvo una tendencia a disminuir el TP. De igual manera, el extracto clorofórmico a 10 mg/ml, también redujo el tiempo de protrombina. Por otra parte, todos los extractos con 20 mg/ml de concentración, tuvieron un incremento en el TP con respecto al plasma sin extracto.

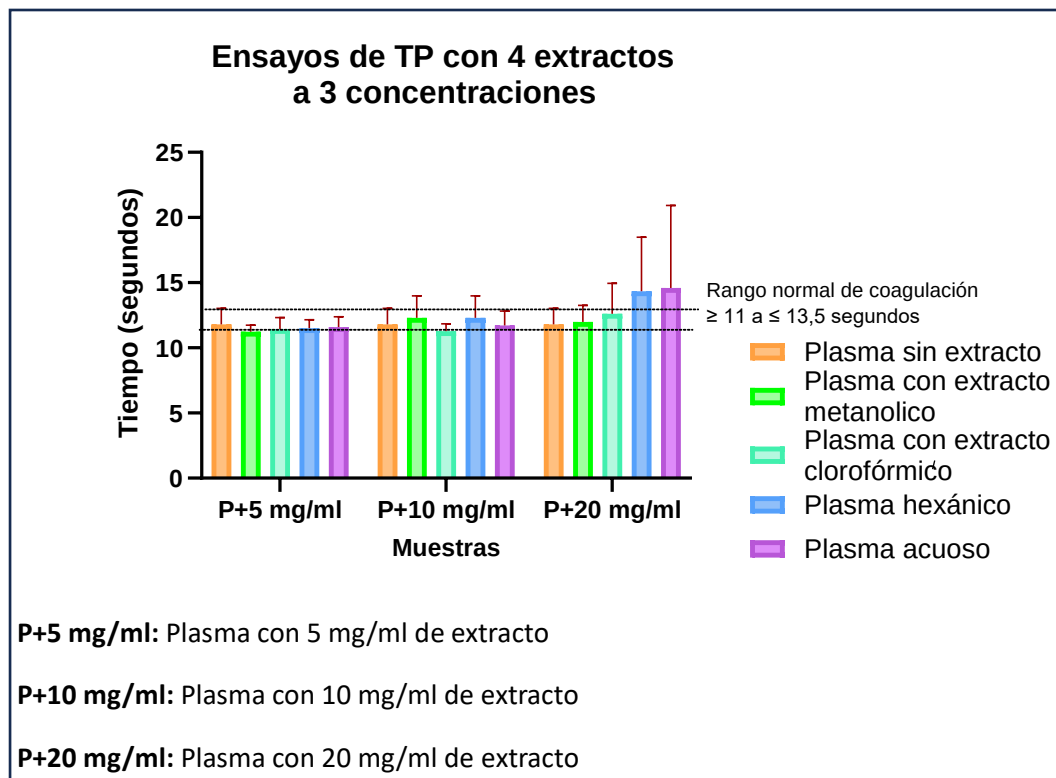


Figura 3. TP a 3 concentraciones (5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml) con 4 extractos en el plasma sanguíneo de 7 pacientes.

En la Figura 4, a pesar de que no se observó la presencia de diferencias significativas, se puede ver que todos los extractos con 5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml de concentración, tienen una tendencia a disminuir el tiempo de tromboplastina parcial (TTP). Cabe recalcar que el extracto acuoso, a una concentración de 5 mg/ml fue el que redujo más el TTP comparado con los demás extractos. A la concentración de 10 mg/ml, se pudo observar una mayor tendencia a reducir el tiempo de tromboplastina parcial en el extracto hexánico, en relación con los otros extractos. Por otra parte, el extracto metanólico a 20 mg/ml fue el que tuvo una mayor tendencia a disminuir el tiempo de coagulación en todos los ensayos de la Figura 4.

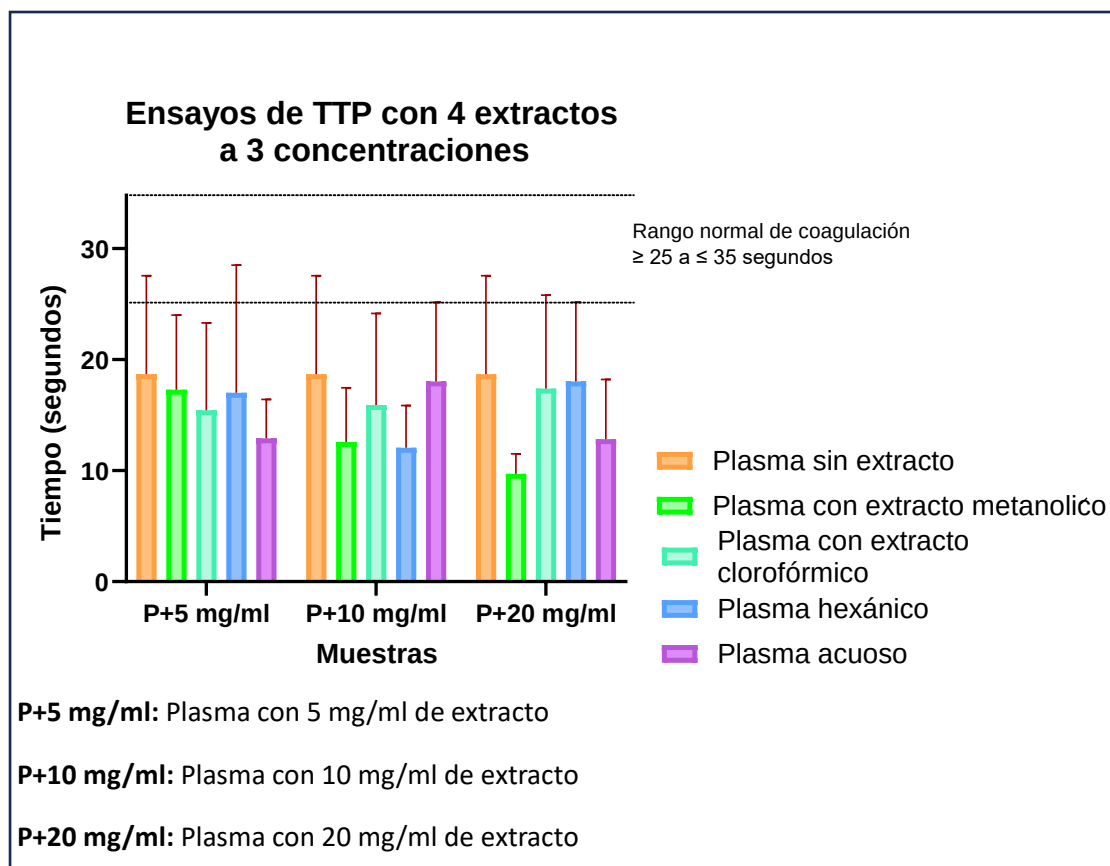


Figura 4. TTP a 3 concentraciones (5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml) con 4 extractos en el plasma sanguíneo de 7 pacientes.

Por otro lado, se pudo determinar que en el tiempo de fibrinógeno (Figura 5), el extracto clorofórmico a 5 mg/ml tuvo una mayor tendencia a una reducción del tiempo de fibrinógeno con respecto a los demás extractos. En cuanto al extracto hexánico con 10

mg/ml tuvo una mayor tendencia a disminuir el tiempo de fibrinógeno. Finalmente, a 20 mg/ml, el extracto metanólico fue el que tuvo una mayor tendencia a reducir el tiempo de los ensayos desarrollados en la Figura 5.

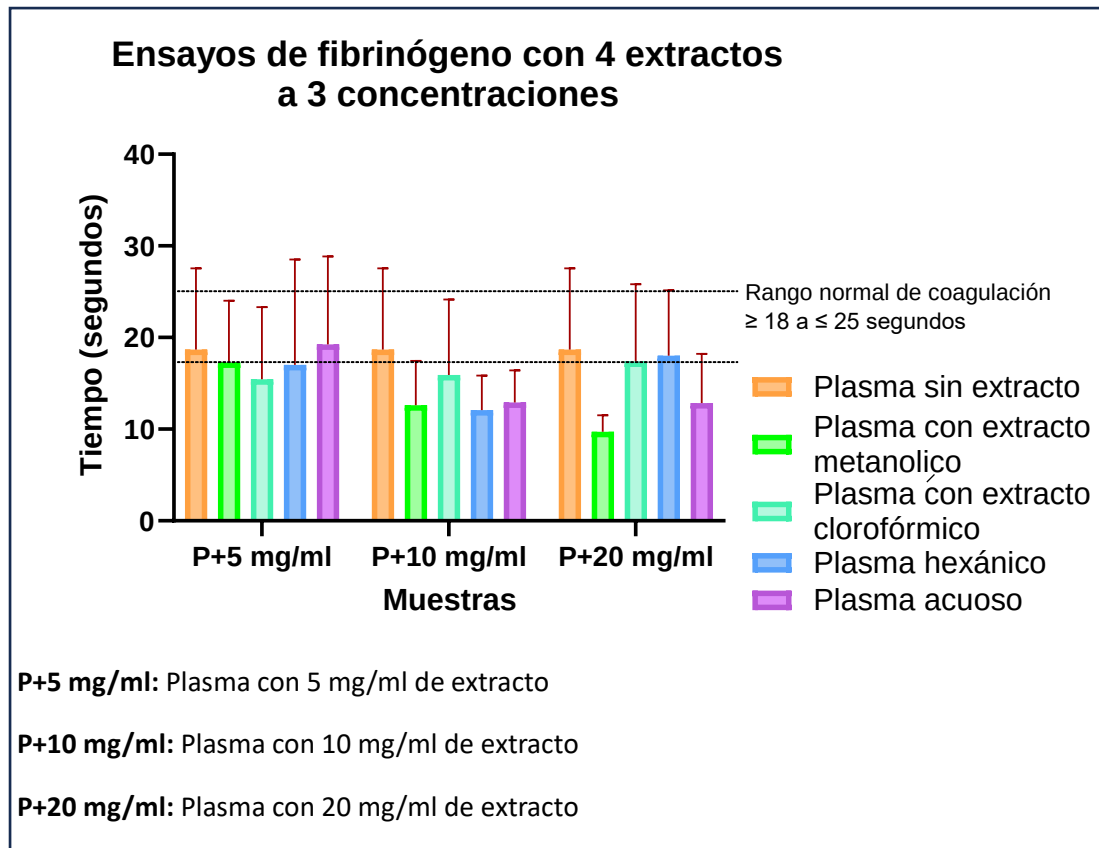


Figura 5. Fibrinógeno a 3 concentraciones (5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml) con 4 extractos en el plasma sanguíneo de 7 pacientes.

En los ensayos preliminares, se ha escogido al extracto metanólico como el extracto con mejor capacidad de optimizar y regular el tiempo de coagulación en los ensayos, ya que en las pruebas de TP, TTP y fibrinógeno fue el que más ha tenido una tendencia en reducir el tiempo en dichos ensayos. A pesar de que a 20 mg/ml el extracto metanólico disminuyó más que los demás extractos en las pruebas de TTP y fibrinógeno, se concluyó que la concentración adecuada es de 5 mg/ml. Esto es, porque en el tiempo de protrombina, la concentración de 20 mg/ml de este extracto incrementó el TP con respecto al plasma sin extracto. Por otro lado, con el extracto metanólico a 5 mg/ml en todas las pruebas, incluyendo la del tiempo de protrombina, tuvo una tendencia a reducir el tiempo de coagulación.

3.7. Efecto del extracto metanólico 5 mg/ml sobre los tiempos de coagulación

Se clasificaron los pacientes según sus tiempos de coagulación sin los extractos, resultando en 3 grupos para TP, TTP y fibrinógeno: pacientes con tiempo menor al rango normal (riesgo de trombosis) ("GT"), pacientes con tiempo dentro del rango normal ("GN") y pacientes con tiempo mayor al rango normal (riesgo de hemofilia) ("GH").

3.7.1. Clasificación de las muestras según sus valores de tiempo de coagulación sin extracto.

3.7.1.1. Tiempo de protrombina.

Para el tiempo de protrombina, las muestras ubicadas en el GT fueron aquellas cuyo TP del plasma sin extracto resultaron < 11 segundos. En el GN se ubicaron las muestras cuyos valores sin extracto en el tiempo de protrombina fueron ≥ 11 a ≤ 13.5 segundos. En el GH, estuvieron ubicadas las muestras cuyos resultados para TP sin extracto resultaron > 13.5 segundos.

En la Figura 6 se puede observar que no hay diferencia significativa en GT (tiende a incrementar los valores de TP), ni en GN (tiende a disminuir los valores de TP). En cambio, para el grupo GH, hay una diferencia significativa entre el grupo en comparación al plasma sin extracto.

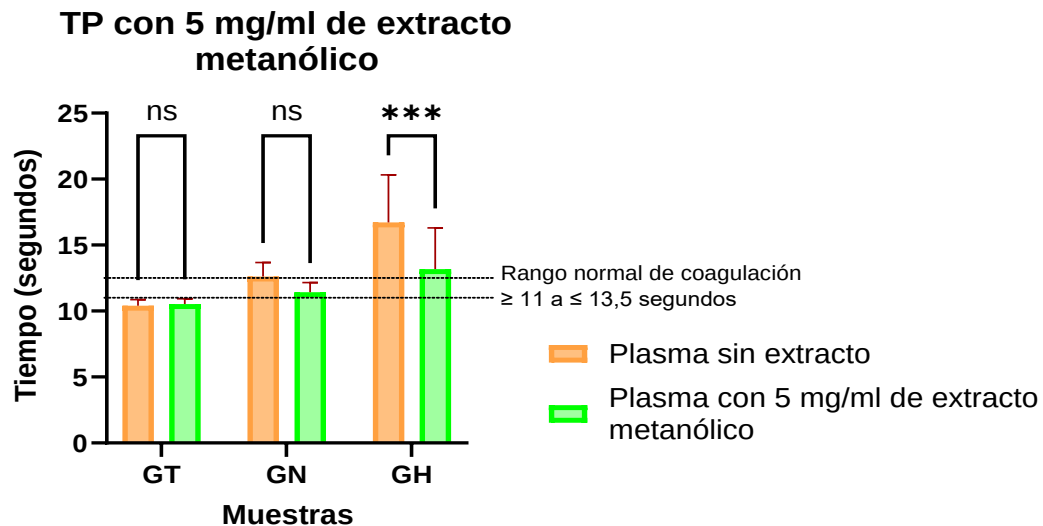


Figura 6. Tiempo de protrombina entre el plasma sin extracto vs plasma con extracto metanólico.

3.7.1.2. *Tiempo de tromboplastina parcial.*

Para el tiempo de tromboplastina parcial, las muestras ubicadas en el GT fueron aquellas cuyo TTP del plasma sin extracto resultaron < 25 segundos. En el GN se ubicaron las muestras cuyos valores sin extracto en el tiempo de tromboplastina fueron ≥ 25 a ≤ 35 segundos. En el GH, estuvieron ubicadas las muestras cuyos resultados para TTP sin extracto resultaron > 35 segundos.

Se pudo visualizar en la Figura 7, que hubo una diferencia significativa en el grupo GH, mientras que, en los otros dos grupos, no hubo una diferencia notoria entre las muestras con extracto y las muestras con 5 mg/ml de extracto metanólico en tiempo de tromboplastina parcial.

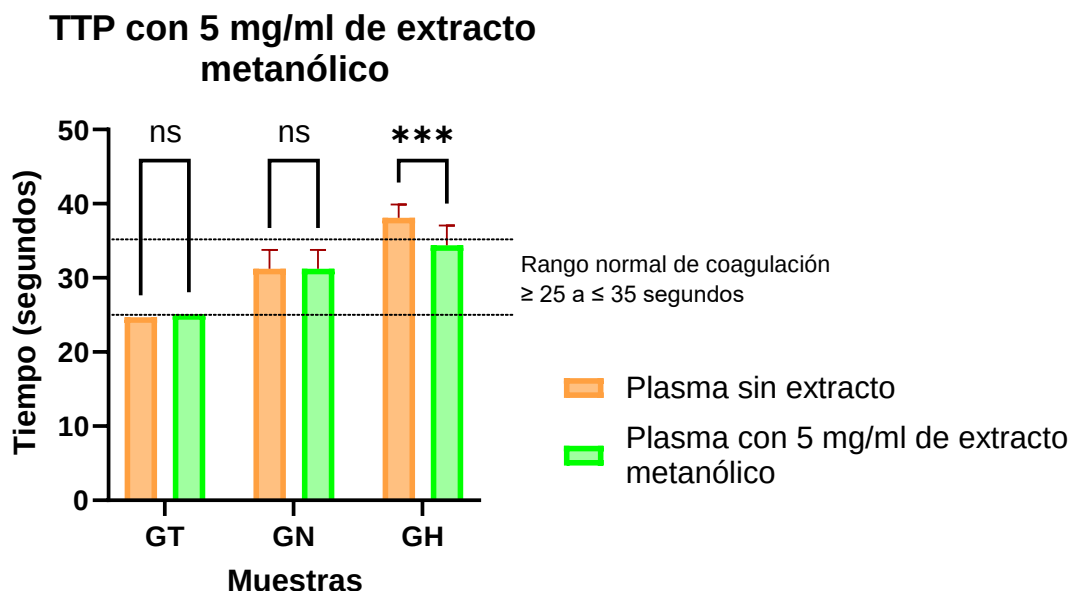


Figura 7. Tiempo de tromboplastina parcial entre el plasma sin extracto vs plasma con extracto metanólico.

3.7.1.3. *Tiempo de fibrinógeno.*

Para el tiempo de fibrinógeno, las muestras ubicadas en el GT fueron aquellas cuyo tiempo de fibrinógeno del plasma sin extracto resultaron < 18 segundos. En el GN se ubicaron las muestras cuyos valores sin extracto en el tiempo de fibrinógeno fueron ≥ 18 a ≤ 25 segundos. En el GH, estuvieron ubicadas las muestras cuyos resultados para el tiempo de fibrinógeno sin extracto resultaron > 25 segundos.

En el caso del tiempo de fibrinógeno se pudo ver la presencia de una diferencia significativa entre el grupo GH con el plasma sin extracto, mientras que en los grupos GT y GN, tienden a incrementar el tiempo de esta prueba, sin embargo, la diferencia no es significativa en estos dos últimos (Figura 8).

Fibrógeno con 5 mg/ml de extracto metanólico

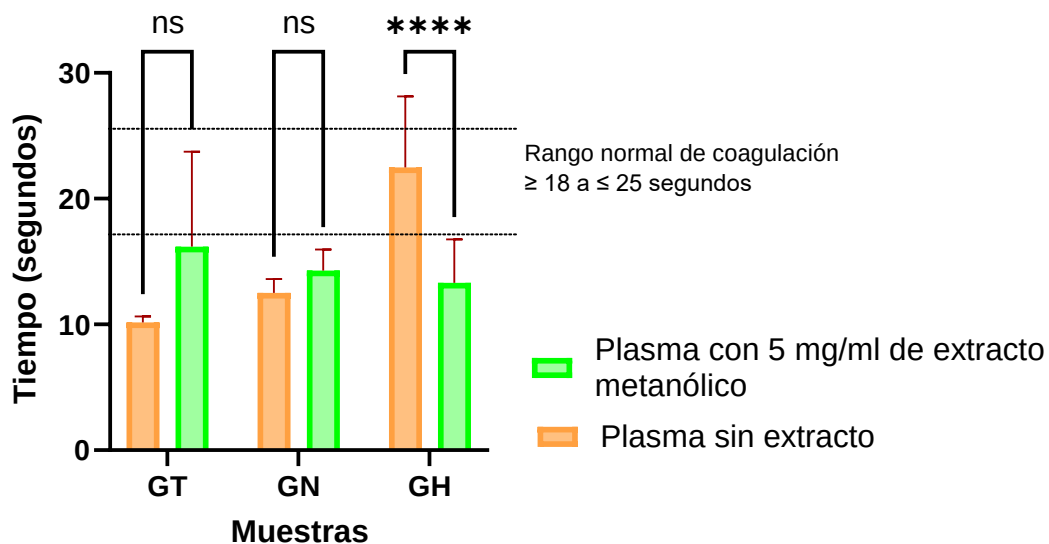


Figura 8. Tiempo de fibrinógeno entre el plasma sin extracto vs plasma con extracto metanólico.

3.8. Ensayos químicos cualitativos

En la Tabla 5 se pudo determinar que en el extracto de cloroformo y hexano no hubo presencia de flavonoides, polifenoles, terpenoides ni alcaloides. En el extracto metanólico, las pruebas de detección de flavonoides, polifenoles, terpenoides y alcaloides dieron resultados moderadamente positivos. En el extracto acuoso se observaron que las pruebas de detección de los flavonoides y polifenoles fueron muy positivas, mientras que en la detección de alcaloides se obtuvieron resultados moderadamente positivos, y negativos en terpenoides.

Tabla 5. Ensayos para la determinación de metabolitos secundarios de la especie *Kalanchoe pinnata*.

EXTRACTO	METABOLITOS SECUNDARIOS	HOJAS
METANOL	Flavonoides	+
	Polifenoles	+
	Terpenoides	+
	Alcaloides	+
CLOROFORMO	Flavonoides	-
	Polifenoles	-
	Terpenoides	-
	Alcaloides	-
HEXANO	Flavonoides	-
	Polifenoles	-
	Terpenoides	-
	Alcaloides	-
AGUA	Flavonoides	++
	Polifenoles	++
	Terpenoides	-
	Alcaloides	+

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

Durante la estandarización, se determinó que el extracto metanólico a 5 mg/ml fue el más eficiente para la actividad coagulante de Kp al evaluar las 3 vías de coagulación: extrínseca (TP), intrínseca (TTP) y vía común (fibrinógeno). Dicho extracto mostró una diferencia al acortar el tiempo de coagulación en el tiempo de tromboplastina parcial y fibrinógeno a una concentración de 20 mg/ml (Figura 4 y Figura 5, respectivamente). Sin embargo, no fue seleccionado para los ensayos posteriores, ya que, al aumentar la concentración, los segundos necesarios para coagular el plasma incrementaron en las pruebas del tiempo de protrombina, generando inestabilidad en el proceso hemostático.

Es importante destacar que, el extracto clorofórmico, hexánico y acuoso, pese a no haber tenido una diferencia significativa con respecto a las muestras sin extracto en el tiempo de protrombina, presentaron una actividad anticoagulante en la vía extrínseca. Pues, se observó una relación directamente proporcional entre la concentración del extracto y el TP. En otras palabras, a medida que aumentaba la concentración del extracto, también lo hacía el tiempo para la síntesis del coágulo. A pesar de ello, el extracto acuoso tuvo tendencia a disminuir el tiempo de coagulación en el tiempo de tromboplastina parcial y fibrinógeno.

La coagulación, es un mecanismo de protección vital responsable de prevenir la pérdida sanguínea, sellando los sitios de lesión del sistema vascular (Waizel Haiat, n.d.). Para detectar si hay problemas en este proceso, existen 3 pruebas: tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina y de fibrinógeno. Los valores estándar para estas pruebas son: TP ≥ 11 a ≤ 13.5 segundos; TTP ≥ 25 a ≤ 35 segundos; y fibrinógeno ≥ 18 a ≤ 25 segundos (Vayne et al., 2021).

Si el tiempo para formar un coágulo excede estos rangos, indica anomalías en la cascada de coagulación. En este contexto, los ensayos realizados con pacientes cuyos plasmas

tardaron más del tiempo estándar en formar coágulos se observó una disminución en los ensayos de TP, TTP y fibrinógeno de los tiempos de coagulación al agregar extracto metanólico a 5 mg/ml en las muestras. No obstante, en los pacientes con un rango de tiempo menor o igual al establecido, la adición del extracto no produjo cambios significativos. Esto demostró que el extracto metanólico contiene metabolitos que estabilizan y activan la cascada de coagulación, reduciendo y regulando el tiempo de coagulación en muestras anómalas sin afectar significativamente las muestras normales o menores.

En la cascada de coagulación se cree que interfirieron los flavonoides presentes en el metanol, ya que actúan como agentes quelantes frente al zinc presente en el plasma (Hrubša et al., 2022). Por ende, se observó una disminución de los tiempos de TP, TTP y fibrinógeno, esto, a causa de que los flavonoides que poseen grupos funcionales hidroxilos y carbonilos, que donan electrones y forman enlaces coordinados con el Zinc (Kejík et al., 2021). Bibliográficamente se ha demostrado que, las catequinas y antocianinas; son los responsables de la actividad coagulante que poseen los flavonoides, además de poder modular las vías de la coagulación (Liao et al., 2023).

Los terpenoides que se identificaron en el extracto metanólico pudieron haber contribuido en la regulación del tiempo de coagulación, al equilibrar las actividades del tromboxano A2 (estimula la procoagulación) junto a la prostaciclina (contrarresta la procoagulación) (Liu et al., 2019). Estos compuestos estimulan la agregación plaquetaria y a su vez, previenen la formación excesivamente rápida de coágulos, lo que ayuda a mantener el equilibrio hemostático (Olas et al., 2020). Además, investigaciones atribuyen que este metabolito favorece la producción de la fibronectina, que es una glicoproteína presente de manera soluble en el plasma e insoluble en la matriz extracelular de los tejidos (Dong et al., 2017). La fibronectina no solo promueve la migración celular, si no que cumple roles importantes en la coagulación ya que actúa junto al Factor de Von Willebrand, en la adhesión óptima de las plaquetas con el colágeno; y es capaz de unirse al fibrinógeno, fibrina, heparina, factor XIII, acelerando así este proceso biológico (Keesler et al., 2021).

A pesar de que los polifenoles son reconocidos por ser metabolitos anticoagulantes que inhiben directamente la actividad del factor Xa de la coagulación, se observó que hubo una reducción en el tiempo de TP, TTP y fibrinógeno con el extracto metanólico al haber la presencia de flavonoides, terpenoides y alcaloides que podrían haber actuado como reguladores en la cascada de coagulación (Bijak et al., 2014). Existen alcaloides que tienen la capacidad de aumentar el factor de Von Willebrand, fibrina, el fibrinopéptido A, fibrinógeno e inhibir el plasminógeno, por ello han sido utilizadas para tratamientos postparto con el fin de evitar hemorragias en los pacientes (Chen et al., 2020).

La presencia de estos 4 metabolitos en el extracto metanólico, resultó en una sinergia que favoreció la coagulación; sin embargo, el extracto acuoso mostró una actividad anticoagulante en la vía extrínseca (evaluada mediante pruebas de TP), posiblemente por la ausencia de terpenoides. Los polifenoles pudieron haber inhibido el factor Xa, contribuyendo a la actividad anticoagulante. Simultáneamente, el extracto demostró una actividad coagulante en la vía intrínseca (evaluada mediante pruebas de TTP) y vía común (evaluada mediante tiempo de fibrinógeno), por la presencia de: alcaloides, ya que incrementan los niveles de factores y proteínas de la vía común como los fibrinopéptidos y el fibrinógeno; y flavonoides, ya que actúan como agentes quelantes frente al zinc presente en el plasma.

Pese a haber sido utilizado las hojas de la especie *Kalanchoe pinnata* en los 4 extractos, se obtuvieron resultados variables en las pruebas de TP, TTP y fibrinógeno, esto es, consecuencia de la polaridad de los solventes. El hexano al ser un solvente no polar presenta una baja electronegatividad con constante dieléctrica de 1.9, careciendo de polo positivo y negativo; como consecuencia, no extrajo alcaloides, flavonoides, polifenoles y terpenoides, lo que mostró su ineficiencia en la actividad coagulantes en las pruebas realizadas con el plasma (Aguilar-Hernández et al., 2022). De igual manera, el cloroformo al ser apolar con una constante dieléctrica de 4.81, su extracto tuvo un efecto insignificante con respecto a la coagulación debido a la ausencia de metabolitos (Malik et al., 2020). En cambio, el extracto acuoso al ser polar, con una constante

dieléctrica de 79.99, extrajo flavonoides y polifenoles, mientras que los alcaloides estuvieron presentes por el pH neutral del agua; se deduce que la presencia de estos 3 tres metabolitos en el extracto fue la razón por la que este tuvo una actividad anticoagulante en la vía extrínseca, y coagulante en la vía intrínseca y común. No obstante, el metanol es un solvente polar por la presencia del grupo hidroxilo (tiene un oxígeno altamente negativo unido a un hidrógeno), con una constante dieléctrica de 33.3 (Zhou et al., 2020). Estas características permitieron la extracción moderadamente positiva de flavonoides, polifenoles y terpenoides, y el pH de 6.74, permitió la extracción de los alcaloides, razón por la que redujo el tiempo de coagulación en el tiempo de protrombina, tromboplastina y fibrinógeno.

En consecuencia, los flavonoides, polifenoles y alcaloides fueron más solubles en agua y metanol, mientras que los terpenoides estuvieron presentes solo en el extracto metanólico. La ausencia de los metabolitos secundarios en los extractos de cloroformo y hexano fue a causa de la baja solubilidad de estos compuestos en los solventes.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se realizó la estandarización de PBS (1x) y DMSO con el plasma y los reactivos comerciales, mediante las pruebas de protrombina, tromboplastina parcial y fibrinógeno. En donde, se determinó que 25 µl de PBS 1X mezclados con 75 µl de plasma, no alteró el tiempo de coagulación con respecto al control; mientras que, el DMSO, no lo modificó con 10 µl de este diluyente y 90 µl de plasma.

Por otro lado, se realizaron pruebas preliminares en las muestras plasmáticas de 7 pacientes, donde se compararon los resultados entre los extractos metanólico, de cloroformo, de hexano y acuoso a concentraciones de 5, 10 y 20 mg/ml. Se determinó que el extracto metanólico fue el más eficiente en cuanto a la disminución del tiempo de coagulación. Los extractos de cloroformo y hexano mostraron resultados irrelevantes en este proceso. El extracto acuoso presentó una actividad anticoagulante en la prueba de TP, mientras que, en las pruebas de TTP y fibrinógeno produjo una reducción de tiempo en estas vías. Además, se escogió la concentración de 5 mg/ml, porque redujo el tiempo de coagulación en todos los ensayos de tiempo de coagulación desarrollados (TP, TTP y fibrinógeno).

Se evaluó la actividad coagulante en 35 muestras con el extracto metanólico a 5 mg/ml, y se estableció que, actuó como un regulador en la cascada de coagulación, dado que, en el plasma de pacientes cuyo tiempo sin extracto tardó más que el estándar, se redujeron los segundos en los ensayos. Al contrario, en los pacientes con tiempo estándar o menor, la diferencia de segundos entre el plasma sin extracto y con extracto fue mínima.

Además, en los ensayos fitoquímicos cualitativos (ensayo de NaOH, cloruro férrico, Salkowski y Dragendorff) se identificó la presencia de flavonoides (incolores), polifenoles (violeta oscuro), terpenoides (amarillo) y alcaloides (precipitado café) en el extracto metanólico, mientras que en el extracto acuoso se logró presenciar flavonoides,

polifenoles y alcaloides. En los extractos de cloroformo y hexano no se extrajeron los 4 metabolitos mencionados.

REFERENCIAS

- Adedapo, A., Adewuyi, T., & Sofidiya, M. (2013). Phytochemistry, anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Lagenaria breviflora* (Cucurbitaceae) in laboratory animals. In *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN* (Vol. 61, Issue 1).
- Aguilar-Hernández, G., Zepeda-Vallejo, L. G., García-Magaña, M. de L., López-García, U. M., Aguilera-Aguirre, S., & Montalvo-González, E. (2022). Contenido de acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.): Evaluación de diferentes condiciones de extracción. *Biotecnia*, 24(2), 12–19. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i2.1453>
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pérez Pacheco, N. O., Álvarez Sandoval, J. H., & Giraldo Aristizabal, C. I. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3597>
- Bijak, M., Ponczek, M. B., & Nowak, P. (2014). Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.023>
- Cambroner Ulate, P., Cerdas Fernández, A., & Chang Chen, V. (2022a). Fisiopatología de la cicatrización patológica. *Revista Medica Sinergia*, 7(5), e820. <https://doi.org/10.31434/rms.v7i5.820>
- Cambroner Ulate, P., Cerdas Fernández, A., & Chang Chen, V. (2022b). Fisiopatología de la cicatrización patológica. *Revista Medica Sinergia*, 7(5), e820. <https://doi.org/10.31434/rms.v7i5.820>
- Castillo, J., & Moncayo, S. (2021). Actividad biológica y composición química en extractos de *Cucurbita ecuadorensis* H.C. Cutler & Whitaker. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 13(2), 92–104. <https://doi.org/10.53591/cna.v13i2.1193>
- Chen, Y., Chen, Q., Wang, X., Sun, F., Fan, Y., Liu, X., Li, H., & Deng, Z. (2020). Hemostatic action of lotus leaf charcoal is probably due to transformation of flavonol aglycons from flavonol glycosides in traditional Chinses medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112364>
- Cruz, E. A., Reuter, S., Martin, H., Dehzad, N., Muzitano, M. F., Costa, S. S., Rossi-Bergmann, B., Buhl, R., Stassen, M., & Taube, C. (2012). *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine*, 19(2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.030>
- Dong, L., Luo, Q., Cheng, L. Z., Yan, Y. M., Cheng, Y. X., & Wang, S. M. (2017). New terpenoids from *Resina Commiphora*. *Fitoterapia*, 117, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.013>
- Dorgalaleh, A., Favaloro, E. J., Bahraini, M., & Rad, F. (2021). Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR). In *International Journal of Laboratory Hematology* (Vol. 43, Issue 1, pp. 21–28). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13349>

- Elbaz, C., & Sholzberg, M. (2020). An illustrated review of bleeding assessment tools and common coagulation tests. In *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 4, Issue 5, pp. 761–773). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/rth2.12339>
- Hernández-Caballero, M. E., Sierra-Ramírez, J. A., Villalobos-Valencia, R., & Seseña-Méndez, E. (2022). Potential of *Kalanchoe pinnata* as a Cancer Treatment Adjuvant and an Epigenetic Regulator. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27196425>
- Hernández-Pérez, A. L., Ramírez-Morales, K., Lagarda-Cuevas, J., Revilla-Monsalve, C., Bermúdez-Ochoa, G. M., Juárez-Pichardo, J. S., & Gallardo-Hernández, A. G. (2022). Thromboelastography for general surgery. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 45(1), 48–59. <https://doi.org/10.35366/102903>
- Hrubša, M., Tvrdý, V., Kutý, M., Valentová, K., Křen, V., & Mladěnka, P. (2022). Interacción de flavonoides con zinc y enzimas que contienen zinc. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 70 (20), 6134–6144. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.2c01446>
- Jurado, -Morales, Katya, L., Morales, D., & Lisandra Katya, J. (2021). Investigación en Salud Valoración de la Hemostasia y Coagulación por el laboratorio clínico. In *Revista Científica* (Vol. 02).
- Keesler, D. A., Slobodianuk, T. L., Kochelek, C. E., Skaer, C. W., Haberichter, S. L., & Flood, V. H. (2021). Fibronectin binding to von Willebrand factor occurs via the A1 domain. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 5(5). <https://doi.org/10.1002/rth2.12534>
- Kejlik, Z., Kaplánek, R., Masařík, M., Babula, P., Matkowski, A., Filipenský, P., Veselá, K., Gburek, J., Sýkora, D., Martásek, P., & Jakubek, M. (2021). Iron complexes of flavonoids-antioxidant capacity and beyond. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 2, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22020646>.
- Kumar Biswas, S., Chowdhury, A., Das, J., Zahid Hosen, S. M., Uddin, R., & Rahaman, M. S. (2021). A review of the traditional medicinal uses of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). In *International Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 10, Issue 1). www.internationalscholarsjournals.org
- Liao, X., Ji, P., Chi, K., Chen, X., Zhou, Y., Chen, S., ... y Huang, M. (2023). Inhibición mejorada de la proteína disulfuro isomerasa y actividad antitrombótica de un derivado de la rutina: complejo rutina: Zn. *RSC advances*, 13 (17), 11464–11471. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/ra/d3ra01135f>
- Liu, X., Dong, J., Liang, Q., Wang, H. min D., Liu, Z., Xu, R., & Kang, W. (2019). Coagulant Effects and Mechanism of *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. *Molecules*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/molecules24244547>
- López-Villarreal¹, S., Abelardo Chávez-Montes², D., Leos-Rivas³, C., Osvelia Rodríguez-Luis⁴, D., Castro-Ríos⁵, R., & Pérez-Hernández⁶, R. (n.d.). *Evaluación antimicrobiana y coagulante de extractos de cinco vegetales de interés etnobotánico* *Antimicrobial and coagulating evaluation of extracts of five vegetables of ethnobotanical interest*. <https://doi.org/10.19136/hs.a21n3.5001>
- Malik, P. K., Tripathy, M., Kajjam, A. B., & Patel, S. (2020). Preferential solvation of: P -nitroaniline in a binary mixture of chloroform and hydrogen bond acceptor solvents: The role of

- specific solute-solvent hydrogen bonding. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(6), 3545–3562. <https://doi.org/10.1039/c9cp05772b>
- Moreno, L. G. N., Agosto, J. G., & Hipólito, C. N. (2023a). Composición fitoquímica y propiedades antioxidantes de la planta mala madre (*Kalanchoe pinnata*). *South Florida Journal of Development*, 4(1), 201–214. <https://doi.org/10.46932/sfjdv4n1-014>
- Moreno, L. G. N., Agosto, J. G., & Hipólito, C. N. (2023b). Composición fitoquímica y propiedades antioxidantes de la planta mala madre (*Kalanchoe pinnata*). *South Florida Journal of Development*, 4(1), 201–214. <https://doi.org/10.46932/sfjdv4n1-014>
- Olas, B., Urbańska, K., & Bryś, M. (2020). Saponinas como moduladores del sistema de coagulación sanguínea y perspectivas respecto a su uso en la prevención de incidentes tromboembólicos venosos. *Molecules*, 25 (21), 5171. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25215171>
- Párraga Espinoza, Y., & Vinueza Quinatoa, M. A. (2020). Aporte a la innovación de la coctelería tradicional conservando la identidad cultural ecuatoriana. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 7(2), 52–57. <https://doi.org/10.26423/rctu.v7i2.526>
- Rahman, R., Al-Sabahi, J. N., Ghaffar, A., Nadeem, F., & Umar, A. (2019). Phytochemical, morphological, botanical, and pharmacological aspects of a medicinal plant: *Kalanchoe pinnata*-A review article. In *IJCBS* (Vol. 16). www.iscientific.org/Journal.html
- Reibán Espinoza, E. A., Sanmartín Calle, Y. A., & Reibán Sanmartín, E. A. (2020). Trombocitopenia por agregados plaquetarios: reporte de caso. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de La Universidad de Cuenca*, 38(1), 65–71. <https://doi.org/10.18537/rfcm.38.01.09>
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. In *European Surgical Research* (Vol. 49, Issue 1, pp. 35–43). <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Reyes Gil, M. (2019). Overview of the Coagulation System. In *Transfusion Medicine and Hemostasis* (pp. 559–564). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813726-0.00091-x>
- Sabdoningrum, E. K., Hidanah, S., Chusniati, S., & Soeharsono. (2021). Characterization and Phytochemical Screening of Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) Extract's Nanoparticles Used Ball Mill Method. *Pharmacognosy Journal*, 13(6), 1568–1572. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.200>
- Sang, Y., Roest, M., de Laat, B., de Groot, P. G., & Huskens, D. (2021). Interplay between platelets and coagulation. In *Blood Reviews* (Vol. 46). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100733>

- Santana-Romo, F., & Zacconi, F. C. (2023). Virtual Screening and Analysis of Enzyme-Ligand Complexes for Factor Xa (FXa) in the Human Coagulation Cascade. *Bionatura*, 8(4). <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.04.27>
- Saravanan, V., Murugan, S. S., & Kumaravel, T. S. (2020). Genotoxicity studies with an ethanolic extract of Kalanchoe pinnata leaves. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 856–857. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503229>
- Satyam, A., Graef, E. R., Lapchak, P. H., Tsokos, M. G., Dalle Lucca, J. J., & Tsokos, G. C. (2019). Complement and coagulation cascades in trauma. *Acute Medicine & Surgery*, 6(4), 329–335. <https://doi.org/10.1002/ams2.426>
- Stefanowicz-Hajduk, J., Hering, A., Kowalczyk, M., Hałasa, R., Gucwa, M., & Ochocka, J. R. (2023). Kalanchoe sp. Extracts—Phytochemistry, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities. *Plants*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/plants12122268>
- T, L. (2021). Anticariogenic Activity Of Silver Nanoparticles Synthesized Using Fresh Leaves Extract Of Kalanchoe Pinnata. *International Journal of Dentistry and Oral Science*, 2985–2987. <https://doi.org/10.19070/2377-8075-21000607>
- Vargas, A., Herrera, I., Nualart, N., Guézou, A., Gómez-Bellver, C., Freire, E., Díaz, P. J., & López-Pujol, J. (2022). The Genus Kalanchoe (Crassulaceae) in Ecuador: From Gardens to the Wild. *Plants*, 11(13). <https://doi.org/10.3390/plants11131746>
- Vayne, C., Gruel, Y., & Pouplard, C. (2021a). Hemostasia: fisiología y principales pruebas de exploración. *EMC - Tratado de Medicina*, 25(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(21\)44685-4](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(21)44685-4)
- Vayne, C., Gruel, Y., & Pouplard, C. (2021b). Hemostasia: fisiología y principales pruebas de exploración. *EMC - Tratado de Medicina*, 25(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(21\)44685-4](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(21)44685-4)
- Waizel Haiat, S. (n.d.). *mx revisión sistemática An Orl Mex 2017 abr* (Vol. 62, Issue 2). www.otorrino.org.mx
- Yarlequé Chocas, M., la Torre Gallardo, G., Jiménez Arrunátegui, Y., & Santos Bandy, M. (2020). Análisis de hierro y polifenoles en macroalgas pardas y rojas de la Antártida. *Consensus*, 25(1), 135–148. <https://doi.org/10.33539/consensus.2020.v25n1.2451>
- Zhou, Y., Gong, S., Xu, X., Yu, Z., Kiefer, J., & Wang, Z. (2020). The interactions between polar solvents (methanol, acetonitrile, dimethylsulfoxide) and the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(fluorosulfonyl)imide. *Journal of Molecular Liquids*, 299. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112159>

ANEXOS

ANEXO 1: Tiempo de protrombina en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue < 11 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
1	TP (segundos)	10,9	11
5	TP (segundos)	9,9	10,1
24	TP (segundos)	10,2	10,4
26	TP (segundos)	10,9	10,9
35	TP (segundos)	10,1	10,3

ANEXO B: Tiempo de protrombina en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue ≥ 11 a $\leq 13,5$ segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
2	TP (segundos)	12,4	9,8
4	TP (segundos)	13,4	11,7
6	TP (segundos)	12,1	11,6
7	TP (segundos)	13,1	11,2
10	TP (segundos)	11,3	11,4
11	TP (segundos)	11,8	11,1
13	TP (segundos)	13,2	12,7
19	TP (segundos)	13	11,8
20	TP (segundos)	12,9	12
21	TP (segundos)	14,8	11,1
22	TP (segundos)	13,3	11,2
23	TP (segundos)	12,9	12,5
27	TP (segundos)	13,3	11,1
28	TP (segundos)	12,2	11,7
30	TP (segundos)	11,6	10,9
32	TP (segundos)	13,2	12,1
35	TP (segundos)	10,1	10,3

ANEXO C: Tiempo de protrombina en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue > 13,5 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
3	TP (segundos)	16,5	13,9
8	TP (segundos)	28,4	23,1
9	TP (segundos)	15,1	9,5
12	TP (segundos)	17,6	12,9
14	TP (segundos)	17,8	13,7
15	TP (segundos)	15	12,9
16	TP (segundos)	15,4	13,5
17	TP (segundos)	16,5	14
18	TP (segundos)	15,1	11,6
25	TP (segundos)	14,9	12,8
29	TP (segundos)	16,4	12,3
31	TP (segundos)	14	11,6
33	TP (segundos)	13,9	11,9
34	TP (segundos)	17,5	10,7

ANEXO D. Tiempo de tromboplastina parcial en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue < 25 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
28	TTP (segundos)	24,7	25,1

ANEXO E. Tiempo de tromboplastina parcial en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue ≥ 25 a ≤ 35 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
1	TTP (segundos)	34,2	32,7
5	TTP (segundos)	31,7	31,4
6	TTP (segundos)	31,4	35,2
8	TTP (segundos)	34,3	33,8
10	TTP (segundos)	27,7	30
11	TTP (segundos)	32,6	29
12	TTP (segundos)	27,4	27,5
14	TTP (segundos)	32,6	30,4

15	TTP (segundos)	32,3	30,5
17	TTP (segundos)	33,7	31,9
19	TTP (segundos)	28,8	30,3
20	TTP (segundos)	34,7	33,2
21	TTP (segundos)	27,6	28,1
23	TTP (segundos)	30,2	29,6
24	TTP (segundos)	32,3	31,4
30	TTP (segundos)	33,1	32,6
31	TTP (segundos)	30,1	29,7
32	TTP (segundos)	32,8	30
33	TTP (segundos)	26,4	27,1
35	TTP (segundos)	31	30,7

ANEXO F. Tiempo de tromboplastina parcial en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue > 35 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5mg/ml
2	TTP (segundos)	35,6	35,1
3	TTP (segundos)	37,8	35,6
4	TTP (segundos)	38,3	35,9
7	TTP (segundos)	35,1	33,7
9	TTP (segundos)	38,2	42,2
13	TTP (segundos)	38,2	34,6
16	TTP (segundos)	42,1	33,7
18	TTP (segundos)	37,4	30,8
22	TTP (segundos)	37,7	34,7
25	TTP (segundos)	36,6	32,3
26	TTP (segundos)	38,5	32
27	TTP (segundos)	39,1	33,4
29	TTP (segundos)	40,8	34,8
34	TTP (segundos)	37,9	32,5

ANEXO G. Fibrinógeno en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue < 18 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
2	FIBRINÓGENO (segundos)	9,7	27,4
6	FIBRINÓGENO (segundos)	17,3	11,9
7	FIBRINÓGENO (segundos)	11,8	15,6
9	FIBRINÓGENO (segundos)	13,3	16,8
11	FIBRINÓGENO (segundos)	13,5	14,6
12	FIBRINÓGENO (segundos)	9,9	13,7
13	FIBRINÓGENO (segundos)	16,1	9,3
14	FIBRINÓGENO (segundos)	11,2	12,7
16	FIBRINÓGENO (segundos)	13,7	13,4
19	FIBRINÓGENO (segundos)	14,1	8,3
20	FIBRINÓGENO (segundos)	10,2	11,4
23	FIBRINÓGENO (segundos)	15,1	11,8
25	FIBRINÓGENO (segundos)	17,9	13,0
26	FIBRINÓGENO (segundos)	10,8	12,3
27	FIBRINÓGENO (segundos)	11,6	12,7
31	FIBRINÓGENO (segundos)	14,7	12,1
34	FIBRINÓGENO (segundos)	14,2	11,2

ANEXO H. Fibrinógeno en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue ≥ 18 a ≤ 25 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
4	FIBRINÓGENO (segundos)	19,2	14,7
15	FIBRINÓGENO (segundos)	22,7	14,9
17	FIBRINÓGENO (segundos)	19,3	10,7
22	FIBRINÓGENO (segundos)	21,4	12,6
28	FIBRINÓGENO (segundos)	23,4	19,9
30	FIBRINÓGENO (segundos)	20,9	9,3
35	FIBRINÓGENO (segundos)	19,4	13,5

ANEXO I. Fibrinógeno en pacientes cuyo tiempo sin extracto fue > 25 segundos.

PACIENTE	PRUEBAS	PLASMA SIN EXTRACTO	5 mg/ml
3	FIBRINÓGENO (segundos)	28,5	14,6
5	FIBRINÓGENO (segundos)	32	17,5
8	FIBRINÓGENO (segundos)	29,1	10,7
10	FIBRINÓGENO (segundos)	29,9	17,2
18	FIBRINÓGENO (segundos)	25,3	12,5
21	FIBRINÓGENO (segundos)	30,4	11,7
24	FIBRINÓGENO (segundos)	25,4	12,1
29	FIBRINÓGENO (segundos)	28,6	13
32	FIBRINÓGENO (segundos)	25,7	12,5
33	FIBRINÓGENO (segundos)	28,1	23,9